

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of)	
)	
Yoshihiro NAKAO et al.)	Group Art Unit: Unassigned
)	
Application No.: Unassigned)	Examiner: Unassigned
)	
Filed: March 4, 2004)	Confirmation No.: Unassigned
)	
For: SCREENING METHOD FOR GENES)	
OF BREWING YEAST)	

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 057677/2003

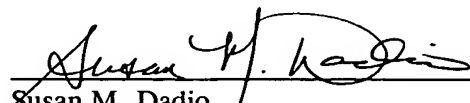
Filed: March 4, 2003

In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign application. Said prior foreign application will be referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: March 4, 2004

By: 
Susan M. Dadio
Registration No. 40,373

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 5 7 6 7 7
Application Number:

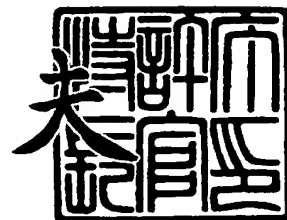
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 5 7 6 7 7]

出 願 人 サントリー株式会社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 9 8 3 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 S07J1000

【提出日】 平成15年 3月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12C 11/00

C07K 14/395

C12N 15/09

C12P 11/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 サントリー
株式会社研究センター内

【氏名】 中尾 嘉宏

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 サントリー
株式会社研究センター内

【氏名】 中村 規尚

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 サントリー
株式会社研究センター内

【氏名】 児玉 由紀子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 サントリー
株式会社研究センター内

【氏名】 藤村 朋子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号 サントリー
株式会社研究センター内

【氏名】 芦刈 俊彦

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【電話番号】 06-4796-1300

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 醸造用酵母遺伝子のスクリーニング法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (イ)工業用酵母の全ゲノム塩基配列を解析し、(ロ)該ゲノム塩基配列を *Saccharomyces cerevisiae* の全ゲノム塩基配列と比較し、(ハ) *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子がコードするアミノ酸配列と 70～97% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする当該工業用酵母の遺伝子を選択し、(ニ)当該選択された遺伝子の機能解析を行うことによって当該遺伝子が酵母に付与する特性を同定することを特徴とする、アルコール又は酒類の製造においてその生産性の向上及び／又は香味の改善に関わる遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項 2】 工業用酵母が、醸造用酵母であることを特徴とする請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】 醸造用酵母が、ビール酵母であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のスクリーニング方法によって得られる遺伝子。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の遺伝子を酵母で発現させた場合、当該酵母の培養液中の亜硫酸濃度が上昇することを特徴とする請求項 4 に記載の遺伝子。

【請求項 6】 配列番号：1 又は 2 で表される塩基配列からなる DNA 又は当該 DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA。

【請求項 7】 配列番号：3 又は 4 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド又は配列番号：3 又は 4 で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 8】 請求項 4～7 のいずれかに記載の遺伝子又は DNA を有する組換えベクター。

【請求項 9】 請求項 4～7 のいずれかに記載の遺伝子又は DNA の上流に、プロモーター及び／又はターミネーターを設置していることを特徴とする請求項 8 に記載の組換えベクター。

【請求項 10】 プロモーターが、構成的な発現をするプロモーターであることを特徴とする請求項 9 に記載の組換えベクター。

【請求項 11】 プロモーターが、グリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項 9 又は 10 に記載の組換えベクター。

【請求項 12】 請求項 4 ～ 11 のいずれかに記載の遺伝子、DNA 又は組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 13】 *Saccharomyces* 属酵母であることを特徴とする請求項 12 に記載の形質転換体。

【請求項 14】 請求項 4 ～ 8 のいずれかに記載の遺伝子又は DNA によりコードされるポリペプチド又は該ポリペプチドが有するアミノ酸配列において、1 ～ 数個のアミノ酸残基が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 15】 配列番号：3 又は 4 に表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド又は配列番号：3 又は 4 で表されるアミノ酸配列において、1 ～ 数個のアミノ酸残基が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 16】 請求項 12 又は 13 に記載の形質転換体を用いることを特徴とするアルコール又は酒類の製造方法。

【請求項 17】 請求項 4 若しくは 5 に記載の遺伝子又は請求項 6 若しくは 7 に記載の DNA 上の遺伝子の発現を制御することを特徴とするアルコール又は酒類の製造に適した酵母の育種方法。

【請求項 18】 酵母が、*Saccharomyces* 属であることを特徴とする請求項 17 に記載の育種方法。

【請求項 19】 請求項 17 又は 18 に記載の育種方法により得られる酵母。

【請求項 20】 請求項 19 に記載の酵母を用いるアルコール又は酒類の製造方法。

【請求項 21】 請求項 20 に記載のアルコール又は酒類の製造方法を用いて製造されるアルコール又は酒類。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ビールや清酒等の酒類、燃料用アルコール等の製造に用いられる工業用酵母、特に酒類の製造に用いられる醸造用酵母の遺伝子のスクリーニング方法に関する。詳しくは、酒類の製造において、醸造用酵母の塩基配列情報をデータベース化し、その生産性の向上及び／又は香味の安定化や増強等の香味の改善に関わる遺伝子を選択する方法、その選択された遺伝子が破壊された酵母又は該遺伝子を高発現する酵母等、該遺伝子の発現が制御された醸造に適した酵母を育種する方法並びに育種された酵母を用いて酒類を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

工業用酵母を用いて、燃料用アルコール、ビールや清酒等の酒類等の製造技術の開発が行われている。特に醸造用酵母を用いての酒類の製造において、酒類の生産性を向上させたり、また香味を安定化させたり向上させたり等、香味を改善するための技術の開発が盛んに進められている。

世界で最も飲用されている酒類はビールであり、2001年度の世界の生産量は約1億4,000万kLである。ビールの種類は、酵母の種類と発酵の方法により大きく三つに分けられる。醸造所に棲み付いた酵母や微生物を利用して発酵させる自然発酵ビール、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*: 以降、*S. cerevisiae*と略す) に属する上面発酵酵母を用いて20～25℃の温度で発酵し、その後の熟成期間を短かくするエールタイプのビール、およびサッカロミセス パストリアヌス (*S. pastorianus*) に属する下面発酵酵母を用いて6～10℃の温度で発酵させ、その後低温熟成させるラガータイプのビールの3種類である。現在世界のビール生産量の9割以上はラガータイプのビールであり、従って、このラガータイプビールの醸造に使用されている下面発酵酵母は、ビール醸造において最も広く用いられている。

【0003】

上記の醸造用酵母を含め、微生物を用いて生産する、いわゆる発酵生産におい

ては、発酵プロセスを最適化すること、及び有用な菌株を選択・育種することが、生産性の向上及び生産物の品質向上にとって重要である。

例えばビール醸造の場合、ビール醸造プロセスの最適化には、エタノールを初めとするアルコール類やエステル、有機酸といった酵母の代謝物をモニターし、温度や通気量、あるいは原料濃度などを制御する方法が行われている。これらの制御は、ビール酵母の細胞内外への物質移送及び細胞内物質代謝をブラックボックスとして扱っており、極めて表面的な制御を行なっているに過ぎない。また、例えば酒類に高い香味性を付与する等の目的から、ビール醸造中の酸素供給量を抑制するプロセス制御方法等が試みられているが、この方法では酸素不足によって酵母の増殖速度自体が低下し、発酵の遅延や品質の低下等の悪影響を引き起こす場合等がある。従って、発酵プロセスの最適化による生産性及び品質の向上には限界があった。

【0004】

一方、有用な工業用酵母、例えば有用なビール酵母を育種する方法としては、これまでは育種というよりも優良菌株の選択という手法が広く用いられていた。ビール醸造そのものはパスツールによる微生物の発見よりはるか以前から行われており、ビール醸造においては、ビール醸造所で用いられている優良なビール酵母を選択するという方法が伝統的に行われ、積極的に優良形質をもつビール酵母を育種した例は少ない。

例えば積極的な育種方法として、薬剤や放射線による人為的な突然変異誘発を利用する方法があるが、醸造用酵母、とりわけビール醸造に広く用いられている下面発酵酵母は高次倍数体であることが多く、かかる高次倍数体の酵母においては、変異を起こしたい対立遺伝子の全てに変異を起こさないと目的の変異株が得られない。従って、望む変異を引き起こすことは、一倍体の実験室酵母で可能であっても、高次倍数体のビール酵母では実質的には不可能である。

近年になって、下面発酵酵母から孢子分離をおこない、それらを用いた変異導入や交雑による育種が試みられている（例えば非特許文献1参照）。しかしながら、高次倍数体である下面発酵酵母は、複雑な染色体構成のために増殖能を持つ孢子の分離は難しく、さらにその中から優良形質を有する菌株を取得することは

殆ど不可能に近い。

また、最近では遺伝子工学的な手法を用いて、目的とする遺伝子を醸造用酵母に導入・発現することが可能になり、遺伝子の機能解析や、機能解析された遺伝子を利用して、望ましい形質を持つ酵母を育種することが可能となった。ところが、既に全ゲノム塩基配列が知られているパン酵母 (*S. cerevisiae*、例えば非特許文献 2 参照) と比べて、下面発酵酵母では全ゲノム塩基配列が知られておらず、下面発酵酵母に特有の醸造特性に関する遺伝子、及びビール醸造における当該遺伝子の働きについてもごくわずかな知見しかない。

【0005】

近年、構造遺伝子あるいは構造遺伝子領域以外のゲノム領域の部分 DNA 断片を固定支持体に固着した DNA マイクロアレイ、DNA チップ等を用い、膨大な数の遺伝子についてその解析が行われている。例えば、Olsenらは、GeneFilters (Research Genetics社製) を用い、醸造中における下面発酵酵母の網羅的遺伝子発現解析を行っている (例えば非特許文献 3 参照)。しかしながら、下面発酵酵母の全ゲノム塩基配列が明らかにされていないことから、正確にはどの遺伝子の発現をモニターしたのかは不明であり、結果として下面発酵酵母の物質代謝解析や、有用酵母の育種、ビール醸造プロセス制御に応用するための情報としては極めて不十分である。

【0006】

近年、*S. cerevisiae*、大腸菌 (例えば非特許文献 4 参照)、結核菌 (例えば非特許文献 5 参照) を初め、既に 100 種以上の微生物全ゲノム塩基配列が決定されており (例えば非特許文献 6 参照)、決定された全塩基配列に基づき、その微生物特有の遺伝子の同定、その特有の遺伝子と公知の遺伝子との塩基配列における比較が行われ、遺伝学的、生化学的、分子生物学的な実験をすることなく、膨大な数の遺伝子の機能推定がなされている。しかしながら、産業上広く利用されている醸造用酵母のような高次倍数性を有する工業用酵母は、特に複雑な染色体の構成を有し、アセンブリ (塩基配列を連結する作業) が難しいと予想されることから、近縁種のゲノム 2 種類が複雑に混ざり合った下面発酵酵母に関しては、全ゲノム塩基配列の決定はいまだ報告されていない。

【0007】

具体的なアルコール又は酒類の製造において、例えば酒類の香味の改善を目的とした技術開発として、製品中の亜硫酸濃度を高める技術が挙げられる。亜硫酸は、高い抗酸化効果を有する化合物であり、食品や飲料、医薬品などの分野では酸化防止剤として広く用いられ、酒類においても同様に酸化防止剤として利用されている。例えば長期間の熟成を必要とするワインでは、亜硫酸はその品質保持性に重要な役割を果たしている。またビール醸造においても、製品に含まれる亜硫酸濃度の上昇に依存して品質保持期間が長期化することが知られており、製品中の亜硫酸含有量を高めれば、香味安定性に優れ、長期の品質保持期間を有する製品を製造することができる。

【0008】

製品中の亜硫酸含量を増加させる最も簡単な方法は、亜硫酸を添加することである。日本国内では、亜硫酸残留濃度が350ppm以下まで、ワインに限り、亜硫酸添加が厚生労働省により許可されている。しかしながらその場合、亜硫酸は食品添加物として扱われるため、食品添加物に対する消費者のマイナスイメージ等を考慮すれば、ビールに亜硫酸を添加することは好適ではない。

【0009】

しかしながら醸造で用いられる酵母は、その生命活動に必要な含硫アミノ酸等の含硫化合物を生合成するために、培地中の硫酸イオンを還元して硫化水素を生成している。亜硫酸はその中間代謝産物であり、酵母のこの能力を利用して、醸造中に亜硫酸を産生させ、その亜硫酸を細胞外に効率的に排出することができれば、発酵液中及び製品中の亜硫酸含有量を増加させることが可能であると考えられた。

【0010】

醸造工程で発酵液中の亜硫酸濃度を上昇させる方法としては、発酵プロセスの制御による方法と、醸造用酵母の育種による方法がある。発酵プロセスの制御による方法では、ビール発酵中の亜硫酸の生成量が初期酸素供給量と逆比例することから、発酵工程における酸素供給量を低減させて、亜硫酸の生成量を増加させるとともにその酸化を抑制する方法等が試みられている。しかしながら、この方

法では酸素不足によって酵母の増殖速度が低下し、発酵の遅延や品質の低下を引き起こす等の悪影響があるため実用的とはいえない。

【0011】

一方、醸造用酵母の育種による方法には、上述した通り、遺伝子操作技術を用いた方法の開発が進められている。例えば、酵母の硫黄代謝において、亜硫酸 (SO_2) が含硫アミノ酸やビタミンの生合成経路における中間生成物であり、細胞外から取り込まれた硫酸イオン (SO_4^{2-}) から、硫酸イオン (SO_4^{2-}) \rightarrow APS (adenylylsulfate) \rightarrow PAPS (phosphoadenylylsulfate) \rightarrow 亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) という還元反応を経て生成されることに着目し、ここで硫酸イオン (SO_4^{2-}) \rightarrow APS (adenylylsulfate) の反応に関与する MET3 遺伝子、APS (adenylylsulfate) \rightarrow PAPS (phosphoadenylylsulfate) の反応に関与する MET14 遺伝子の遺伝子コピー数を増加させることによって、酵母の亜硫酸生成能を向上させることを試みた例 (例えば非特許文献7参照)、また MET10 遺伝子の破壊によって亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) の還元を阻害し、酵母の亜硫酸生成量を増加させようと試みた例 (例えば非特許文献8参照) が開示されている。これらの試みによれば、MET10 遺伝子破壊株の亜硫酸生成量は親株の10倍以上まで増加したが、その一方で、若干の発酵の遅延およびビール成分中のアセトアルデヒドと1-プロパノール含有量の増加が認められるなど、これら育種された酵母を実用化するには問題があった。

【0012】

よって、遺伝子操作技術を用いた工業用酵母、例えば醸造用酵母の育種方法の開発が進められてはいるものの、醸造用酵母のゲノム情報が乏しいために、醸造用酵母の醸造特性に関わる遺伝子を選択し、当該遺伝子がコードするタンパク質の機能を解析し、それらの知見を育種に利用することが十分に行えないのが現状である。

従って、発酵速度や製品の品質を損なうことなく目的とする特性が発揮できる酵母を育種する方法は未だ確立されておらず、該方法の開発が、醸造のみならず酵母を用いる産業界において非常に望まれている。

【0013】

【非特許文献 1】 C. ジャーマンセン (C. Gjermansen)、減数分裂分離体の交配によるサッカロマイセスカールスベルゲンシスハイブリッド醸造株の構築 (Construction of a hybrid brewing Strain of *Saccharomyces carlsbergensis* by mating of meiotic segregants)、カールスバーグリサーチコミュニケーション (Carlsberg Res. Commun.)、第46巻、p1-11、1981年

【非特許文献 2】 A. ゴフォーら (A. Goffeau et al.)、酵母ゲノムダイレクトリー (The Yeast Genome Directory)、Nature ネイチャー (Nature)、第387巻、p5-105、1997年

【非特許文献 3】 K. オールセン (K. Olesen et al.)、ラガービール発酵の製造スケール中の醸造用酵母サッカロマイセス カールスベルゲンシスの遺伝子発現情報 (トランスクリプトーム) の動態 (The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during a production-scale lager)、FEMS イーストリサーチ (FEMS Yeast Research)、第2巻、p563-573、2000年

【非特許文献 4】 F. R. ブラットナーら (F. R. Blattner et al.)、大腸菌 K-12 株の全ゲノム塩基配列 (The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12)、サイエンス (Science)、第277巻、p1453-62、1997年

【非特許文献 5】 S. T. コールら (S. T. Cole et al.)、全ゲノム塩基配列に基づくマイコバクテリウムチューベルキュロシスの生物学的解析 (Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence)、ネイチャー (Nature)、第393巻、p537-544、1998年

【非特許文献 6】 ザナショナルセンターフォーバイオテクノロジーインフォメーション (The National Center for Biotechnology Information)、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/micr.html>

【非特許文献 7】 C. コークら (C. Korch et al.)、プロシーディングオブヨーロピアンブルワリィコンベンションコンgres;リスボン (Proc. Eur. Brew. Conv. Congress., Lisbon)、1991年、p201-208

【非特許文献 8】 J. ハンセンら (J. Hansen et al.)、醸造酵母における MET10 遺伝子の不活化により、ビール醸造中の SO₂ 生成が特異的に増加する (Inac

tivation of MET10 in brewer's yeast specifically increases SO₂ formation during beer production)、ネイチャーバイオテクノロジー (Nature Biotech.)、第14巻、p1587-1591、1996年

【非特許文献9】 T. シェンら (T. Sijen et al.)、転写及び転写後の遺伝子抑制は、機構的に関連している (Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related.)、カレントバイオロジー (Curr. Biol.)、第11巻、p436-440、2001年

【非特許文献10】 N. 後藤ら (N. Goto et al.)、ワイン酵母の亜硫酸塩耐性遺伝子SSU1-Rは、SSU1の対立遺伝子であって、SSU1とは異なる上流塩基配列を有する (SSU1-R, a sulphite resistance gene of wine yeast, is an allele of SSU1 with a different upstream sequence.)、ジャーナルオブファーマンテーションアンドバイオエンジニアリング (J. Ferment. Bioeng.)、第86巻、p427-433、1998年

【非特許文献11】 D. アブラムら (D. Avram et al.)、サッカロマイセスセレビシエにおいて、SSU1は硫酸塩の許容度に関与するタンパク質のネットワークにおいて重要な役割を果たすプラズマ膜タンパク質をコードする (SSU1 encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*)、ジャーナルオブバクテリオロジー (J. Bacteriol.)、第179巻、p5971-5974、1997年

【非特許文献12】 H. パークら (H. Park et al.)、サッカロマイセスセレビシエにおいて、SSU1は、硫酸塩の流出を仲介する (SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*)、イースト (Yeast)、第16巻、p881-888、2000年

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、工業用酵母、特にビール等の酒類の製造に用いられる醸造用酵母の全ゲノム塩基配列データベース（以降、ゲノムDBと略す場合もある）を作製し、そのデータベースを基に、醸造用酵母が特異的に有する醸造特性に関わる遺伝子を選択し、その遺伝子の機能解析を行い、その遺伝子を破壊したり、又は高発

現させることにより、目的とする醸造特性に関わる遺伝子を選択する方法を提供することを目的とする。また当該遺伝子に関わる醸造特性を発揮する酵母を育種する方法並びにこの酵母を用いて生産性や品質を向上させたアルコール又は酒類を製造する方法を提供することを目的とする。更には当該醸造用酵母特有の遺伝子及びその遺伝子がコードするペプチドを提供することも目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

工業用酵母として広く用いられている醸造用酵母は異質倍数体であり、少なくとも2種類のゲノムから構成されていることが知られている。その一つは全ゲノム塩基配列が解読されている*S. cerevisiae* 由来のゲノムと考えられているが、もう一方のゲノムの由来は解明されていなかった。

そこで本発明者らは、醸造用酵母の優れた醸造特性の基盤となる、醸造用酵母独特の機能を持つ未同定の遺伝子を見出すために、醸造用酵母の一つである下面発酵酵母の全ゲノム塩基配列を決定した。そして既に全ゲノム配列が明らかにされている*S. cerevisiae*のゲノムDBに登録されているアミノ酸配列と比較し、醸造用酵母の遺伝子がコードするタンパク質の機能推定を行った結果、当該下面発酵酵母の遺伝子は、アミノ酸配列において、*S. cerevisiae*と100%近い同一性を示すSc型遺伝子と、75～97%前後の同一性を示す非Sc型遺伝子に大別されることを明らかにした。更に下面発酵酵母は、Sc型塩基配列だけからなるSc型染色体、非Sc型塩基配列だけからなる非Sc型染色体及び両染色体のキメラであるSc/非Sc型キメラ染色体が混在する複雑な構成となっていることを明らかにした。ビール酵母の全染色体の構成を図1に示す。本発明者らは、本発明で明らかにしたゲノム情報をもとに、このような予想もしない複雑な染色体の構成を知見し、下面発酵酵母に特有の遺伝子のスクリーニング方法、詳しくは、(イ)工業用酵母、特に醸造用酵母の1つである下面発酵酵母の全ゲノム塩基配列を解析し、(ロ)該ゲノム塩基配列を*S. cerevisiae*の全ゲノム塩基配列と比較し、(ハ)*S. cerevisiae*の遺伝子がコードするアミノ酸配列と70～97%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする当該下面発酵酵母の遺伝子を選択し、更に(ニ)当該選択された遺伝子の機能解析を行うことによって当該遺伝

子が酵母に付与する醸造特性を同定することを特徴とする、醸造用酵母に特有の醸造特性に関わる遺伝子のスクリーニング方法に想到した。本発明者らはこれらの知見を基に更に鋭意検討を重ね、本発明を完成するに至った。

【0016】

即ち本発明は、

(1) (イ)工業用酵母の全ゲノム塩基配列を解析し、(ロ)該ゲノム塩基配列を*S. cerevisiae*の全ゲノム塩基配列と比較し、(ハ)*S. cerevisiae*の遺伝子がコードするアミノ酸配列と70～97%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする当該工業用酵母の遺伝子を選択し、(ニ)当該選択された遺伝子の機能解析を行うことによって当該遺伝子が酵母に付与する特性を同定することを特徴とする、アルコール又は酒類の製造においてその生産性の向上及び／又は香味の改善に関わる遺伝子のスクリーニング方法、

(2) 工業用酵母が、醸造用酵母であることを特徴とする前記(1)に記載のスクリーニング方法、

(3) 醸造用酵母が、ビール酵母であることを特徴とする前記(1)又は(2)に記載のスクリーニング方法、

(4) 前記(1)に記載のスクリーニング方法によって得られる遺伝子、

(5) 前記(4)に記載の遺伝子を酵母で発現させた場合、当該酵母の培養液中の亜硫酸濃度が上昇することを特徴とする前記(4)に記載の遺伝子、

(6) 配列番号：1又は2で表される塩基配列からなるDNA又は当該DNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、

(7) 配列番号：3又は4で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド又は配列番号：3又は4で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA、

(8) 前記(4)～(7)のいずれかに記載の遺伝子又はDNAを有する組換えベクター、

(9) 前記(4)～(7)のいずれかに記載の遺伝子又はDNAの上流に、プロモーター及び／又はターミネーターを設置していることを特徴とする前記(

8) に記載の組換えベクター、

(10) プロモーターが、構成的な発現をするプロモーターであることを特徴とする前記(9)に記載の組換えベクター、

(11) プロモーターが、グリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターであることを特徴とする前記(9)又は(10)に記載の組換えベクター、

(12) 前記(4)～(11)のいずれかに記載の遺伝子、DNA又は組換えベクターを含む形質転換体、

(13) *Saccharomyces*属酵母であることを特徴とする前記(12)に記載の形質転換体、

(14) 前記(4)～(8)のいずれかに記載の遺伝子又はDNAによりコードされるポリペプチド又は該ポリペプチドが有するアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(15) 配列番号: 3又は4に表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド又は配列番号: 3又は4で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸残基が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(16) 前記(12)又は(13)に記載の形質転換体を用いることを特徴とするアルコール又は酒類の製造方法、

(17) 前記(4)若しくは(5)に記載の遺伝子又は前記(6)若しくは(7)に記載のDNA上の遺伝子の発現を制御することを特徴とするアルコール又は酒類の製造に適した酵母の育種方法、

(18) 酵母が、*Saccharomyces*属であることを特徴とする前記(17)に記載の育種方法、

(19) 前記(17)又は(18)に記載の育種方法により得られる酵母、

(20) 前記(19)に記載の酵母を用いるアルコール又は酒類の製造方法、

(21) 前記(20)に記載のアルコール又は酒類の製造方法を用いて製造されるアルコール又は酒類、

に関する。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明における工業用酵母 (Industrial Yeast) としては、ビール、ワイン、清酒等の醸造用酵母、燃料用アルコールの生産に用いられる酵母等が挙げられる。具体的には、*Saccharomyces* 属等の酵母が挙げられるが、本発明においては、ビール酵母、例えばサッカロミセス パストリアヌス ヴァイヘンステファン (*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan) 34/70、BH84、NBRC 1951、NBRC 1952、NBRC 1953、NBRC 1954 等が使用できる。またウイスキー酵母、例えば *S. cerevisiae* NCYC90 等、ワイン酵母、例えば協会ぶどう酒用1号、同3号、同4号等、清酒酵母、例えば協会酵母清酒用7号、同9号等も用いることができる。

【0018】

本発明の遺伝子のスクリーニング方法は、(イ)工業用酵母、特に醸造用酵母の1つである下面発酵酵母の全ゲノム塩基配列を解析し、(ロ)該ゲノム塩基配列を *S. cerevisiae* の全ゲノム塩基配列と比較し、(ハ) *S. cerevisiae* の遺伝子がコードするアミノ酸配列と70～97%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする当該下面発酵酵母の遺伝子を選択し、更に(ニ)当該選択された遺伝子の機能解析を行うことによって当該遺伝子が酵母に付与する醸造特性を同定することを特徴とする。

また、本発明のスクリーニング方法によって得られた醸造用酵母に特有の醸造特性に関わる遺伝子を利用して、当該遺伝子を酵母で高発現させたり、当該遺伝子を遺伝子破壊する等の発現制御を行うことにより、優れた醸造特性を有する酵母を育種することができる。従って、本発明の遺伝子のスクリーニング方法によって得られた遺伝子及びその遺伝子にコードされるペプチド、当該遺伝子を利用した工業用酵母の育種方法、当該育種方法によって得られた酵母、および当該酵母を用いたアルコール又は酒類の製造方法も本発明の範囲内である。

【0019】

(イ) 工業用酵母の全ゲノム塩基配列の決定

工業用酵母の全ゲノム塩基配列の決定には、まず (a) 酵母よりゲノム DNA を調製し、(b) ショットガンライブラリー及び (c) コスミドライブラリーを作製し、次いで (d) これらのライブラリークローンを用いて塩基配列決定に用いる DNA 断片を調製し、(e) シーケンス反応によってライブラリー DNA 断片の塩基配列を決定し、(f) 該 DNA 断片をアセンブリして全ゲノム塩基配列を再構築する過程が含まれる。

(a)～(f) に用いられる方法は、特に限定されず、公知の手段に準じて行ってもよいが、それぞれ好ましい方法について以下に記載する。

【0020】

(a) 全 DNA の抽出・精製等の調製は、ミトコンドリア DNA の切断に特に注意して、酵素処理時間を短縮し、攪拌などを緩やかに行うなど、従来の方法、例えば “Yeast a practical approach (IRL PRESS、6.2.1、p228)”、「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝学実験法 (大嶋泰治編、学会出版センター、p84-85、1996)」等に記載の公知の方法に準じて行われるのが好ましい。以下に具体的な好ましい DNA 調製方法の例を示す。

【0021】

ゲノム DNA の調製用酵母菌体を通常の方法により培養する。培地として、該酵母が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれも用いることができる。例えば、YPD 培地 (2% (w/w) グルコース、1% (w/w) 酵母エキス、2% (w/w) ポリペプトン) 等を用いることができる。培養方法としては、約 25～35℃で終夜振とう培養するのがよい。

【0022】

培養後、遠心分離により培養液から菌体を回収する。得られた菌体を洗浄液で洗浄する。該洗浄液として、例えば、バッファー A (50 mM リン酸 Na、25 mM EDTA、1% (v/v) β -メルカプトエタノール、pH 7.5)、等をあげることができる。該洗浄菌体からのゲノム DNA の取得は、リゾチームおよび界面活性剤である SDS 等を用いて該菌体の細胞壁を溶解後、フェノール溶液およびフェノール/クロロホルム溶液を用いて蛋白質等を除き、エタノール

等を用いてゲノムDNAを沈殿させる一般的なゲノムDNAの調製法に準じて行うことができるが、具体的には以下の方法を例示することができる。

【0023】

培養して得られた菌体を、バッファーA (50 mM リン酸Na、25 mM EDTA、1% (v/v) β -メルカプトエタノール、pH 7.5) で洗浄した後に再度バッファーAに懸濁し、約5~10 mgのザイモリエイス-100T (生化学工業) を添加しておだやかに約25~40℃、約30分~2時間振とうする。振とう後、SDSを含むバッファー、例えばバッファーB (0.2 M Tris-HCl、80 mM EDTA、1% SDS、pH 9.5) 等を加えて約60~70℃で約30分静置することにより溶菌させる。溶菌後、氷上で冷却し、5 M酢酸カリウムを加えて混和し、さらに約60分間氷上に静置する。得られた溶液を遠心分離 (例えば5,000 g、10分、15℃) し、回収した上清に等容量のエタノールを添加してDNAを沈殿させ、直ちに遠心分離 (例えば5,000 g、10分、15℃) を行いDNAを回収する。得られた沈殿物を70% (v/v) エタノールで洗浄後、自然乾燥させた後に、DNA懸濁用溶液、例えばTEバッファー (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) 等に溶解し、粗ゲノムDNA溶液を得る。得られた粗ゲノムDNA溶液に塩化セシウム及びBisbenzimidazoleを加えて溶解し、この溶液を超遠心分離 (例えば100,000 g、17時間、25℃) 後、UVライトを照射してDNAバンドを可視化させ、下層のバンドを回収する。回収したDNA溶液から、塩化セシウム溶液で飽和したイソプロパノールを用いてBisbenzimidazoleを抽出・除去し、回収した水層に4倍容量の0.3 M酢酸ナトリウムを加えて混和した後、DNAをエタノール沈殿させ、遠心分離により回収する。回収したDNAをRNase処理後、フェノール/クロロホルム抽出し、回収した水層から再びエタノール沈殿によってDNAを精製する。遠心分離で回収した沈殿を70% (v/v) エタノールで洗浄後、自然乾燥してTEバッファーに溶解し、ゲノムDNA溶液を調製する。

【0024】

(b) ショットガンライブラリーの作製

上記 (a) で調製した酵母のゲノムDNAを用いてゲノムDNAライブラリー

を作製する方法としては、“Molecular Cloning, A laboratory Manual, Third Edition (2001) (以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す)”に記載の方法を用いることができるが、特にショットガン法による全塩基配列の決定に用いるのに適したゲノムDNAライブラリーの作製法としては、以下に記載の方法を例示する事ができる。

【0025】

(a) で調製したゲノムDNAにTEバッファーを加え、Hydroshear(ジンマシーンズ社製)等を用いてゲノムDNAを断片化する。DNAブランディングキット (DNA Blunting kit、宝酒造社製) 等を用いて、ゲノム断片の末端を平滑化したのち、アガロース電気泳動により分画し、約1.5～2.5 kbのゲノム断片をゲルから切り出し、該ゲルにDNA溶出用バッファー、例えばMG溶出バッファー (0.5 mol/L 酢酸アンモニウム、10 mmol/L 酢酸マグネシウム、1 mmol/L EDTA、0.1% SDS) 等を加え、約25～40℃で終夜振とうしてDNAを溶出する。DNA溶出液をフェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿しゲノムライブラリーインサートを得る。T4リガーゼ (宝酒造社製) を用いて、上記インサート全量と、適当なベクター、例えばpUC18SmaI/BAP (Amersham Biosciences社製) 等とを約10～20℃で、約20～50時間ライゲーションする。ライゲーション反応物をエタノール沈殿し、得られた組換えベクターDNAを適量のTEバッファーに溶解する。エレクトロポレーション等の手段により、大腸菌、例えばELECTRO CELL DH5α (宝酒造社製) 株に組換えベクターDNAを形質転換する。エレクトロポレーションは、添付実験マニュアルに示された条件で行うのがよい。

【0026】

ゲノムDNA断片を含有する組換えベクターを導入された形質転換株は、適当な選択培地上で選択される。例えば、ベクターにpUC18SmaI/BAPを用いた場合、形質転換株は約0.01～0.1 mg/mLのアンピシリン、約0.1 mg/mLのX-gal、約1 mmol/Lのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を含むLB平板培地〔1.6%寒天を含むLB培地 (10 g/L バクトトリプトン、5 g/L 酵母エキス、10 g/L 塩化ナトリウム、p

H7. 0)] 上で約30～37℃終夜培養することにより、白色コロニーを形成するため、選択が容易である。該平板培地上に形成されたコロニーより得られた形質転換株を、約0.1mg/mL アンピシリンを含むLB培地を添加した384穴タイタープレート中で、約30～37℃終夜静置培養した後、LBと等倍量の50%グリセロール水溶液を加え、攪拌してグリセロールストックとする。グリセロールストックは通常約-80℃で保存が可能である。

【0027】

(c) コスミドライブラリーの作製

(a) で得られたゲノムDNAを適切な制限酵素、例えばSau3AI（宝酒造社製）等で部分消化する。得られた制限酵素消化DNA断片を、該断片と連結可能な付着末端を生じる制限酵素消化部位を有するコスミドベクター、例えばSuper Cos Iベクター（ストラタジーン社製）を用いる場合は、Sau3AI消化DNA断片を該ベクターのBamHI部位に挿入することが可能である。制限酵素処理及び連結は、添付のプロトコールに従って行うとよい。この方法により得られた連結産物を、Gigapack III Gold（ストラタジーン社製）等を用いてパッケージングを行い、添付実験手順マニュアルに従い、大腸菌、例えばXL1-Blue MR株（ストラタジーン社製）等に導入する。これをアンピシリンを含むLB平板培地に塗抹し、約30～37℃で終夜培養する。得られたコロニーは、アンピシリン添加LB培地を有する96穴タイタープレートの各ウェル中で、約30～37℃終夜培養した後、前記LBと等倍量の50%グリセロール含有LB培地を加え、攪拌してグリセロールストックとする。グリセロールストックは通常約-80℃で保存が可能である。

【0028】

(d) 塩基配列決定用のDNA断片

醸造用酵母のゲノムの全塩基配列を、全ゲノムショットガン法を基本にして決定する。該方法で塩基配列を決定するDNA断片は、上記(b)で調製したショットガンライブラリーよりPCR法を用いて調製する。具体的には、アンピシリンを含むLB培地を、ウェル当り約0.05mLずつ分注した384穴タイタープレートに全ゲノムショットガンライブラリー由来クローンをレプリケーター（

ジンソリューション社製)等を用いて植菌し、約30～37℃で終夜静置培養する。該培養液を、PCR用反応液[TaKaRa Ex Taq (宝酒造社製)]を約0.01 mLずつ分注した384穴リアクションプレート(ABgene社製)に、レプリケーター(ジンソリューション社製)等を用いて移し、GeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社製)等を用い、牧野らのプロトコール“DNA Research、5、p1-9 (1998)”等を用いてPCRを行い、挿入断片の増幅を行う。

PCR産物精製用キット(アマシャムバイオサイエンス社製)等を用いて余剰プライマー及びヌクレオチドの除去を行い、この試料を用いてシーケンス反応を行う。

【0029】

(C)のコスミドライブラリーよりのDNA断片は、以下の方法で調製する。アンピシリンを含む適当な培地、例えば2×YT培地(16 g/L バクトトリプトン、10 g/L 酵母エキス、5 g/L 塩化ナトリウム、pH 7.0)を約1.0 mLずつ分注した96穴プレートの各ウェルに、全コスミドライブラリー由来クローンを植菌し、約30～37℃で終夜振とう培養を行う。該培養液より、プラスミド自動調製機KURABO PI-1100 (倉敷紡績社製)等を用い、倉敷紡績社のプロトコールに従って、コスミドDNAおよびプラスミドDNAを調製し、これをシーケンス反応のDNA断片として用いる。

【0030】

(e) シーケンス反応

シーケンス反応は、市販のシーケンスキット等を用いて行うことができる。以下に、本発明において好ましい例を示す。

DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit(アマシャムバイオサイエンス社製)約2 μlに対し、ショットガンDNAのシーケンス反応には、M13順方向(M13-21)プライマーおよびM13逆方向(M13RV)プライマー(タカラバイオ社製)等を、コスミドDNAのシーケンス反応には、順方向プライマー、例えばSS-cosF.1(配列番号: 7)及び逆方向プライマー、例えばSS-cosR.1(配列番号: 8)等を使用し、上記(b)又は(c)で調製したDNA断片(PCR産物又はプラ

スミド)を混ぜてシーケンス反応液とする。プライマーおよびDNA断片の量は各々約1~4 pmoleおよび約50~200 ngである。該反応液を用い、Gene AmpPCR System9700 (アプライドバイオシステムズ社製)で、約50~70サイクルのダイターミネーターシーケンス反応を行う。サイクルパラメーターは市販のキット、例えばDYEnamic ET Terminator Sequencing Kitを用いる場合には、その付属マニュアルに従う。サンプルの精製はMultiScreen HV plate (ミリポア社製)等を用い、ミリポア社のマニュアルに従って行う。精製された反応物をエタノール沈殿し、得られた沈殿物を乾燥後、約4℃の暗所で保存する。市販のシーケンサー及びアナライザー、例えば MegaBACE1000 Sequencing System (アマシャムバイオサイエンス社製)およびABI PRISM 3700 DNA Analyser (アプライドバイオシステムズ社製)等を用い、付属のマニュアルに従い、該乾燥反応物を分析する。

【0031】

(f) アセンブリ (塩基配列断片を整列して重ね合わせ、連結する作業) によるゲノムDNAの再構築

(4) で得られたDNA断片のシーケンスデータから、ゲノムDNAの再構築を行うことができる。ゲノム塩基配列の再構築の全作業はUNIX (登録商標) プラットフォーム上で行う。ベースコールをphred (The University of Washington)、ベクター配列の除去をCross Match (The University of Washington)、アセンブリをPhrap (The University of Washington)で行う。アセンブリの結果得られるコンティグはグラフィカルエディターconsed (The University of Washington)を用いて解析する。ベースコールからアセンブリまでの一連の作業はconsedに付属するスクリプトphredPhrapを利用することで、一括して行うことができる。

【0032】

(ロ) *S. cerevisiae*の全ゲノム塩基配列との比較

(イ) で得られたゲノム塩基配列と*S. cerevisiae*の全ゲノム塩基配列との比較には、(g) コスミド、ショットガンクローン両端塩基配列、コンティグ塩基配列それぞれの*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との比較データベース作成および*S.*

*cerevisiae*ゲノム塩基配列へのマッピングを行う過程が含まれる。

【 0 0 3 3 】

(g) コスミド、ショットガンクローン両端塩基配列、コンティグ塩基配列それぞれの*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との比較データベース作成および*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列へのマッピング

広く用いられている工業用酵母、例えば下面発酵酵母、例えば*S. pastorianus*等は*S. cerevisiae*とその近縁種（例えば*S. bayanus*等）との自然交雑体であると考えられている”Int. J. Syst. Bacteriol. 35, p 508-511 (1985)”。そこで (e) で得られたコスミド DNA クローンの両端塩基配列を、*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列に対しての相同性検索アルゴリズムによる相同性検索を行うことにより、各塩基配列について、*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列上での相同領域の選択とその同一性を決定し、データベースを作成する。コスミド塩基配列について対応する*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との%同一性分布図の例を図 2 に示す。コスミドの塩基配列は、*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列と約 9 4 % より高い同一性を示す塩基配列群と、約 8 4 % 前後の同一性を示す塩基配列群に大別される。従って、9 4 % より高い同一性を示す塩基配列は、*S. cerevisiae*由来の S c 型塩基配列、約 8 4 % 前後の同一性を示す塩基配列群は*S. cerevisiae*近縁種ゲノム由来の非 S c 型塩基配列とし、S c 型塩基配列又は非 S c 型塩基配列を有する遺伝子を、それぞれ S c 型遺伝子又は非 S c 型遺伝子とする。

【 0 0 3 4 】

同様に (e) で得られたショットガンクローン両端塩基配列と*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との比較データベースを作成する。作成した比較データベースで得られた情報を基にコスミドクローン、ショットガンクローンの*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列上へのマッピングを行う（例えば図 3 参照）。また、(f) で得られたコンティグ塩基配列と*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との比較データベース作成（例えば表 1 参照）を行い、マッピングを行う。マッピング手法は上記に述べた方法とほぼ同様であるが、コスミド、ショットガンクローンのフォワード鎖、リバース鎖が異なるコンティグ内に存在する場合、これらのコンティグ間を連結させる（例えば図 4 参照）。

【0035】

(ハ) *S. cerevisiae*の遺伝子がコードするアミノ酸配列と70～97%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする下面発酵酵母の対応する遺伝子の選択

*S. cerevisiae*の遺伝子がコードするアミノ酸配列と70～97%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする下面発酵酵母の遺伝子を選択する段階には、(h) ORFの同定と機能推定の過程及び(i) ORFの機能解析の過程が含まれる。

(h) ORFの同定と機能推定

(e) でアセンブリした塩基配列中のORF (Open Reading Frame)の同定を行う。好ましい実施例を具体的に下記に示す。開始コドンから終始コドンまで300塩基配列以上の長さを持つ配列を相補鎖も含めて6種類の読み枠についてORFを同定する市販のプログラムを用い、(e) でアセンブリした塩基配列中に存在するORFの同定を行う。

抽出したORFにコードされたタンパク質の機能推定は、Saccharomyces Genome Database (SGD: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>)に登録され、公開されている*S. cerevisiae*のORFのアミノ酸配列との相同性検索により行う。SGDに相同性があるORFがない場合は、ORFのアミノ酸配列をGenBankデータベース由来のタンパク質コード領域からなるデータベースであるnr、SWISSPROT等のアミノ酸データベースに対して、BLASTを用いた相同性検索することにより行う。

【0036】

(i) ORFの機能解析の段階には、(i-1) ORFのクローニング、(i-2) ORFの遺伝子破壊による機能解析、(i-3) 高発現株の解析過程が含まれる。

(i-1) ORFのクローニング

上記(h)で得られたORFの情報に基づき、該下面発酵酵母より対応するORFを、モレキュラー・クローニング第3版等に記載の常法により調製し取得することができる。即ち、ORFに隣接する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それをプライマーとして、下面発酵酵母から得た染色体DNAをDN

A断片として用い、通常のPCRクローニング法により目的のORFをコードするDNAを単離、取得することができる。このようにして取得されるDNAの塩基配列として、例えば、配列番号1又は2で表される塩基配列を有するDNAを挙げることができる。

ORFを例えばここでORF①とすると、ORF①をコードするDNAあるいはORF①をPCR法で増幅するためのプライマーは、上記配列情報に基づき、ポリヌクレオチド合成機を用いて合成することもできる。またORF①をコードするDNAには、上記で取得されるORF①の塩基配列を含むDNAのみならず、該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAも含まれる。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、上記で同定されたORF①の塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法又はサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAをいう。具体的には、ORF①の塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、更に好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、[モレキュラー・クローニング第3版]、"Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)"、"DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)"等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0037】

より具体的には、(e)で得られた比較データベースを用いて、上記ORF①を含むクローンを検索し、相同性及び位置情報等に基づき、完全長の構造遺伝子を含むDNA断片が挿入されたショットガンクローンを取得することができる。染色体DNAのライブラリーから選択した当該クローンに構造遺伝子の全長がない場合は、PCR法によって構造遺伝子の全長をコードするDNA断片を取得する。例えば配列番号: 13および配列番号: 14等で表される合成DNAプライマーを組み合わせる(プライマー対)ことによって、上記構造遺伝子を含むDN

A断片が得られる。同様に、*S. cerevisiae*のDNAをテンプレートとして、既に公開されているSGDの情報を元に設計したプライマー対を用いてPCRを行ない、上記下面発酵酵母のORFに対応する*S. cerevisiae*由来の構造遺伝子の全長を取得する。プライマーには、例えば配列番号：15および16の合成DNAプライマー対を用いることができ、この組み合わせによって*S. cerevisiae*由来の構造遺伝子を含むDNA断片が得られる。

上記のようにして得られる下面発酵酵母由来DNA断片又は*S. cerevisiae*由来DNA断片を、TA cloningキット等を用いて適当なベクター、例えばTA cloningキットに添付のpCR2.1-TOP0ベクターに挿入し、それぞれのDNA断片を含む組換えベクターTOP0/非Sc型遺伝子（下面発酵酵母由来DNA断片を有する組換えベクターはTOP0/非Sc型遺伝子とする）、又は組換えベクターTOP0/Sc型遺伝子（*S. cerevisiae*由来のDNA断片を有するベクターは、TOP0/Sc型遺伝子とする）を取得することができる。得られた下面発酵酵母由来DNAおよび*S. cerevisiae*由来DNAの塩基配列は、サンガーの方法 “F. Sanger, Science, 214, p1215, 1981” により調べることができる。

【0038】

(i-2) ORFの遺伝子破壊による機能解析

文献 “Goldstein et al., yeast. 15, p1541 (1999)” の方法に従い、薬剤耐性マーカーを含むプラスミド（例えばpFA6a (G418^r), pAG25 (nat1)）をテンプレートとしたPCRによって遺伝子破壊用DNA断片を作製することができる。PCR用のプライマーとして、非Sc型遺伝子の破壊には、例えば非Sc型SSU1_for（配列番号：17）/非Sc型SSU1_rv（配列番号：18）等を、ScSSU1遺伝子破壊には例えばScSSU1_for（配列番号：19）/ScSSU1_rv（配列番号：20）等を用いる。非Sc型遺伝子の破壊には、更にプラスミド、例えばpPGAPUR (AUR1-C) 及びプライマー、例えば非Sc型SSU1_for+pPGAPUR（配列番号：21）/非Sc型SSU1_rv+AUR1-C（配列番号22）等を用いることもできる。

上述の方法で作製した遺伝子破壊用DNA断片で醸造用酵母を形質転換する。形質転換は特開平07-303475号公報に記載された方法に従ってよい。ま

た選択薬剤の濃度は、宿主とする酵母の当該薬剤への感受性を測定し、適宜決定すればよい。

ここで得られた形質転換体について、それぞれ用いた薬剤耐性マーカーが導入され、かつ各ORFがコードする遺伝子が破壊されていることをSouthern解析によって確認できる。具体的には、まず親株および形質転換体から抽出した染色体DNAを、Sc型又は非Sc型遺伝子を分別するのに適切な制限酵素を用いて消化(例えば37℃、18hrs)し、これを1.5%アガロースゲル電気泳動で展開後、メンブレンにトランスファーする。以下はAlkphos Direct Labelling Reagents (Amersham) のプロトコールに従って、Sc型あるいは非Sc型遺伝子に特異的なプローブとハイブリダイズ(例えば55℃、18hrs)させ、CDP-Starでシグナルを検出する。

【0039】

親株並びに上記(i-2)で得られた遺伝子破壊株を用いて発酵試験を行うことにより、(i-1)で選択されたORFを有する遺伝子の機能の確認を行うことができる。親株並びに上記(i-2)で得られた遺伝子破壊株の培養は、例えば麦汁を含む培地で、以下の条件で行うことができる。

麦汁エキス濃度	約10～15%
麦汁容量	1～3L
麦汁溶存酸素濃度	約8～10ppm
発酵温度	約15℃
酵母投入量	約8～12g 湿酵母菌体 / 2L麦汁

発酵液を経時的にサンプリングし、酵母増殖量(OD600)、エキス消費量、(i-1)で選択されたORFを有する遺伝子の機能に関わる物質の濃度の経時変化等を調べる。例えば、(i-1)で選択されたORFを有する遺伝子の機能が亜硫酸の排出に関わる場合、発酵液中の亜硫酸濃度の経時変化を測定する。亜硫酸の定量は、酸性下で蒸留により亜硫酸を過酸化水素水に捕集した後、アルカリで滴定することによって行う((財)日本醸造協会 改訂BCOJビール分析法)。

【0040】

(i - 3) 高発現株の解析

非 S c 型遺伝子を構成的に発現することができる当該遺伝子の高発現株を得、当該高発現株の醸造特性を解析することにより、当該遺伝子の醸造特性への関わりを知ることができる。

(i - 3) で得られたプラスミド TOPO / 非 Sc 型遺伝子から、適当な制限酵素処理によって、非 S c 型構造遺伝子の全長を含む DNA 断片を切り出す。これを同様に制限酵素処理した遺伝子発現用ベクター、例えば pNI-NUT 等に挿入し、非 S c 型遺伝子を構成的に発現するベクター (pYI-非 Sc 型遺伝子) を構築する。ベクター pNI-NUT は酵母染色体相同組換え部位として URA3、形質転換マーカーとして nourseothricin 耐性遺伝子 (nat1) およびアンピシリン耐性遺伝子 (Amp^r) を含んでいる。一方、S c 型遺伝子を構成的に発現するベクター (pNI-Sc 型遺伝子) は、上記 pYI-非 Sc 型遺伝子の非 S c 型構造遺伝子部分を、対応する S c 型遺伝子で置換した構造である。ここで導入した非 S c 型遺伝子又は S c 型遺伝子の構成的発現には、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子 (T D H 3) のプロモーターおよびターミネーターを用いるのが好ましい。

上述の方法で作製した構成的発現ベクターを用いて、下面発酵酵母を形質転換する。形質転換は特開平 0 7 - 3 0 3 4 7 5 号公報に記載された方法で行い、選択マーカーである抗生物質等を含む Y P D 平板培地等で選択するのがよい。

【 0 0 4 1 】

高発現の確認は R T - P C R 法等によって行ってよい。t o t a l R N A の抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen) 等を用い、for total RNA isolation from yeast のマニュアルに従って行うのがよい。S c 型遺伝子の特異的プライマーには、例えば ScSSU1_for331 (配列番号： 2 3) / ScSSU1_982rv (配列番号： 2 4) 、非 S c 型遺伝子の特異的プライマーには、例えば nonSc-SSU1_for329 (配列番号： 2 5) / nonSc-SSU1_981rv (配列番号： 2 6) 等、内部標準には、酵母で構成的に発現している遺伝子、例えば A C T 1、P D A 1 等の特異的プライマーである、例えば PDA1_for1 (配列番号： 2 7) / PDA1_730rv (配列番号： 2 8) を用いることができる。P C R 産物を 1. 2 % アガロース電気泳動で展開後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、各遺伝子のシグナル値を内部標準として用いた

遺伝子、例えば P D A 1 等シグナル値で標準化して親株のそれと比較する。こうして確認された構成的発現株を S c 型遺伝子高発現株、非 S c 型遺伝子高発現株とすることができる。

【0042】

親株並びに上記 (i-3) で得られた遺伝子高発現株を用いて発酵試験を行うことにより、(i-1) で選択された O R F をコードする遺伝子の機能の確認を行うことができる。親株並びに上記 (i-3) で得られた遺伝子高発現株の培養は、(i-2) で記載した条件で行うことができる。

(i-2) と同様に、発酵液を経時的にサンプリングし、酵母増殖量 (O D 6 0 0)、エクス消費量、(i-1) で選択された O R F を有する遺伝子の機能に関わる物質の濃度の経時変化等を調べる。

【0043】

上述の醸造用酵母由来の遺伝子 (非 S c 型遺伝子) の O R F を選択することにより、その情報を基に、D N A マイクロアレイと P C R を用いて醸造用酵母の染色体の構造解析を行うことができる。

醸造用酵母又は *S. cerevisiae* からのゲノム D N A の調製は QIAGEN Genomic Tip 100/G (#10243) および QIAGEN Genomic DNA buffer set (#19060) を用いて、キットに添付のマニュアルに従って行う。この D N A 10 μ g を Winzeler らの方法 “Science 281 p 1194-1197, (1998)” に従って DNaseI (インビトロジェン社製) で消化し、ターミナルトランスフェラーゼ (ロッシュ社製) でビオチン化して、D N A マイクロアレイ (Affymetrix Gene Chip Yeast Genome S98 Array) にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションおよびアレイの輝度の検出は Affymetrix 社製 Gene Chip 解析基本システムを用いて行ってよい。

【0044】

S. cerevisiae と醸造用酵母のそれぞれから得たプローブの輝度を発現解析用ソフト (マイクロアレイスイート 5.0) を用いて比較し、輝度の差を *S. cerevisiae* を基準としたシグナル比 (Signal log ratio) として算出する。次に各プローブのシグナル比を表計算ソフト (マイクロソフト Excel 2000) を用いて各染色体ごとに整列させ、シグナル比を棒グラフで表す (例えば図 5 参照)。例えば上記の

条件では、醸造用酵母ゲノムの遺伝子中で *S. cerevisiae* 由来の遺伝子の塩基配列と 100% 近い同一性を有する遺伝子 (S c 型遺伝子) のみがハイブリダイズするために、醸造用酵母ゲノム中の S c 型遺伝子の数が変化することでシグナル比の変化が生じると考えられ、シグナル比の値が大きく変化する箇所では、S c 型塩基配列からなる S c 型染色体と非 S c 型塩基配列からなる非 S c 型染色体 (あるいはその逆) とが繋がったキメラ染色体構造の存在が推定されることになる。

このキメラ染色体構造は、ショットガン法により決定した醸造用酵母のゲノム塩基配列を基に、片側が S c 型、反対側が非 S c 型の塩基配列であるプライマーを設計し、醸造用酵母由来のゲノム DNA を DNA 断片として PCR によって確認することができる。

PCR は、TAKARA LA TaqTM と添付のバッファーを用い、添付のマニュアルに従い、TAKARA PCR Thermal Cycler SP を用いて反応を行う。

【0045】

PCR の結果、醸造用酵母から、一定の長さの DNA 断片が増幅されたことを 0.8% アガロース電気泳動で確認する。ここで、PCR の DNA 断片として実験室株 *S. cerevisiae* のゲノム DNA を用いた場合には DNA 断片の増幅は認められないこととなる。さらに醸造用酵母から増幅された DNA 断片の両端の塩基配列を確認することにより、確かにショットガン法により決定したゲノム塩基配列と一致していることが明らかとなり、その領域内において S c 型染色体と非 S c 型染色体の連結 (乗換え) が生じ、キメラ染色体が形成されていることを確認できる。

【0046】

本発明のスクリーニング方法によって得られる DNA としては、上記で取得される非 S c 型遺伝子の塩基配列を含む DNA および該 DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を挙げることができる。

【0047】

本発明のスクリーニング方法によって得られる DNA とは、一本鎖および二本鎖 DNA を含むが、これらに限定されるものではない。上記で取得される非 S c

型遺伝子の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAには、該遺伝子がコードするタンパク質のコドンの縮重変異体が含まれる。縮重変異体とは、塩基配列では本発明で選択される非Sc型遺伝子の塩基配列と異なっているが、コドンの縮重により同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド断片をいう。

【0048】

具体的な例としては、配列番号：1又は2に示される塩基配列を有するDNA、該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA等をあげることができる。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、上記で同定された非Sc型遺伝子の塩基配列を有するDNA断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のポリヌクレオチドを固定化したフィルターを用いて、約0.7～1.0mol/Lの塩化ナトリウム存在下、約65℃でハイブリダイゼーションを行った後、約0.1～2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、約65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

【0049】

ハイブリダイゼーションは、「モレキュラー・クローニング第3版」、「カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」、「DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)」等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、FASTA、BLAST、Smith-Waterman “Meth. Enzym., 164, p765 (1988)”等の相同性検索ソフトウェアにより、デフォルト(初期設定)のパラメータを用いて計算したときに、配列番号：1又は2に示される塩基配列と少なくとも60%以上の同一性を有するDNA、好ましくは80%以上の同一性を有するDNA、更に好ましくは95%以上の同一性を有するDNAを

あげることができる。

【0050】

また、本発明のスクリーニング方法によって得られるDNAとして、配列番号：3又は4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNAまたは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAをあげることができる。

【0051】

本発明のスクリーニング方法によって得られるDNAによりコードされるポリペプチドとしては、上記で取得されるORFの塩基配列を含むDNAおよび該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAにコードされるポリペプチド又は配列番号：3又は4に表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。

【0052】

さらに、該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ該ポリペプチドの活性と実質的に同一の活性を有するポリペプチドも本発明に含まれる。該ポリペプチドの活性と実質的に同一の活性とは、欠失、置換、または付加する前のポリペプチドが有する固有の機能あるいは酵素活性などに代表される活性と同一の活性を意味している。該ポリペプチドは、「モレキュラー・クローニング第3版」、「カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」、「Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982)」、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)」、「Gene, 34, 315 (1985)」、「Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985)」、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)」等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、取得することができる。例えば、配列番号：3又は4に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。欠失、置換、もしくは付加されるアミノ酸残基の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換、もしくは付加できる程度の数であり、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、更に好ましくは1～5個である。

【0053】

本発明のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、または付加があることを意味し、欠失、置換、または付加が同時に生じてもよく、置換、または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システイン等があげられる。

【0054】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン
B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸
C群：アスパラギン、グルタミン
D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4-ジアミノブタン酸、2, 3-ジアミノプロピオン酸
E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン
F群：セリン、スレオニン、ホモセリン
G群：フェニルアラニン、チロシン
また、得られる変異ポリペプチドが、変異前のポリペプチドの有する活性と実質的に同一の活性を有するためには、変異前のポリペプチドの有するアミノ酸配列と、BLASTやFASTA等の解析ソフトウェアで、デフォルト（初期設定）のパラメータを用いて計算した時に、少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

【0055】

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社製、Perkin elmer社製、Pharmacia社製、Protein Technology Instrument社製、Synthecell-Vega社製、PerSeptive社製、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【0056】

本発明を用いることにより、工業用酵母のゲノムの全塩基配列を決定し、工業用酵母の有用遺伝子を同定することができ、更に該遺伝子の機能の推定が可能となる。工業用酵母特有の遺伝子は産業上有用な遺伝子である場合が多く、その遺伝子を推定された機能に基づいて分類することで、その酵母の特徴が明らかとなり、工業用酵母を育種する上で貴重な情報を得ることができる。例えば工業用酵母が醸造用酵母であるならば、酒類の製造におけるその生産性の向上や香味の改善に関わる遺伝子を同定し、その遺伝子が生産性の向上や香味の改善等にマイナスとなるのであればその遺伝子を破壊して発現を制御したり、或いはアンチセンス法若しくはRNAi法（例えば非特許文献9参照）によって該遺伝子を発現させないか、若しくは発現を抑制することによって、醸造特性の優れた酵母を育種することができる。また当該遺伝子が生産性の向上や香味の改善等にプラスとなるのであればその遺伝子を酵母で高発現させたりして、産業上有用な醸造特性の優れた醸造用酵母を育種することができる。

【0057】

本発明のスクリーニング方法で得られる遺伝子を利用して、有用酵母を育種する例を以下に示す。

ビール醸造において、製品中の亜硫酸含有量を高めれば、香味安定性等に優れた製品を製造することができることは上述した通りである。よって、本発明のスクリーニング方法によって得られる遺伝子が亜硫酸の生成や排出機能に関わる遺伝子であれば、該遺伝子を導入した形質転換体酵母を培養し、当該遺伝子を形質転換体酵母で発現させた場合、培養液中の亜硫酸濃度が上昇して、香味安定性等に優れた製品を製造することができる。

下面発酵酵母は、細胞外から取り込まれた硫酸イオン (SO_4^{2-}) を還元し、亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) を生成することが知られている。ところが、亜硫酸はエネルギー代謝経路においてグリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼを阻害し、酵母自身の細胞内ATP濃度を低下させてしまうため、酵母は過剰量の亜硫酸が細胞内に蓄積しないよう、細胞外へと亜硫酸を排出する機能を有する。ここで亜硫酸感受性変異を相補する遺伝子として単離されたのが、例えばSSU1遺伝子である（例えば非特許文献10参照）。このSSU1遺伝子産物は、458残基のアミノ酸残基からなり、構造解析の結果から、9～10ヶ所の膜貫通領域をもつトランスポーターであることが推定されており（例えば非特許文献11参照）、更にSSU1遺伝子高発現株を用いた実験によって、SSU1遺伝子産物が、亜硫酸の排出に関与していることが既に証明されている（例えば非特許文献12参照）。

【0058】

一般に下面発酵酵母は亜硫酸生成能が高いのに対して、上面発酵酵母は殆ど亜硫酸を生成しない。本発明のスクリーニング方法を用いて下面発酵酵母のゲノムシーケンス解読を行い、その全塩基配列を明らかにすれば、例えばSSU1遺伝子について、下面発酵酵母および上面発酵酵母が共にもつScSSU1遺伝子の他、下面発酵酵母に特有の非Sc型SSU1遺伝子を選択できる。また同様に、亜硫酸の生成に関与するタンパク質をコードするMET14遺伝子についても、下面発酵酵母由来の非Sc型MET14を選択できる。下面発酵酵母特有の高亜硫酸生成能は、例えばこの非Sc型SSU1、非Sc型MET14の機能が大きいに関与しており、より高い亜硫酸生成能を有する酵母の育種を目指すためには、この非Sc型SSU1遺伝子、非Sc型MET14遺伝子等を強化することが効果的である。

これら非Sc型SSU1遺伝子及び非Sc型MET14を強化した酵母の育種方法は、具体的に実施例で述べる。

【0059】

本発明のスクリーニング法で選択された醸造用酵母特有の遺伝子を宿主酵母に導入する際、宿主として用いられる酵母としては、醸造用に使用可能な酵母であ

れば特に限定されないが、現在醸造用酵母として広く用いられている任意の酵母、例えばBH84、NBRC1951、NBRC1952、NBRC1953、NBRC1954等のビール酵母が使用できる。さらに、ウイスキー酵母（例えば*S. cerevisiae* NCYC90）、ワイン酵母（例えば協会ぶどう酒用1号、3号、4号等）、清酒酵母（例えば協会酵母清酒用7号、9号等）も同様に使用できる。

【0060】

上記宿主酵母に遺伝子を導入する際に用いるベクターは、酵母で導入された遺伝子を発現できるベクターであれば特に限定されず、例えば多コピー型プラスミド（YE p型）、単コピー型プラスミド（YC p型）、染色体DNA組み込み型プラスミド（YI p型）のいずれもが利用可能である。例えば、YE p型ベクターとしてはYep51（J. R. Broach et al., *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Academic Press, New York, 83, 1983）等、YC p型ベクターとしてはYCp50（M. D. Rose et al., *Gene*, 60, 237, 1987）等、YI p型ベクターとしてはYIp5（K. Struhl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USP*, 76, 1035, 1979）等が挙げられる。これらのプラスミドは市販されており、容易に入手することができる。

【0061】

上記ベクターは、酵母に導入された遺伝子の発現を調製するその他の配列、具体的には、プロモーター、オペレーター、エンハンサー、サイレンサー、リボソーム結合配列、ターミネーター等を有していてもよい。上記ベクター内において、醸造用酵母特有の遺伝子を発酵初期から構成的に発現させるためのプロモーター及びターミネーターは、醸造用酵母中で機能し、液中の亜硫酸濃度に非依存的であれば、特に限定されず、任意の組み合わせで用いてよい。例えばプロモーターとしては、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（TDH3）遺伝子のプロモーター、3リン酸キナーゼ（PGK）遺伝子のプロモーター等が利用可能である。これらのプロモーターは公知であり、例えばPGK遺伝子は公知文献“M. F. Tuite et al., *EMBO J.*, 1, p603 (1982)”等に詳細に記載されており、容易に入手することができる。

酵母に導入された遺伝子の発現に必要な上記のその他の配列は、本発明のスクリーニング方法によって得られるDNAがこれらを含む限り、特にベクター側に特に備わっていなくてもよい。そのようなその他の配列が該DNAに含まれない場合には、別にその他の配列を調製し、作動可能な状態に該DNAに連結することが好ましい。あるいは、より高い発現量もしくは特異的な発現調節を期待する場合にも、それに見合ったその他の配列を作動可能な状態に該DNAに連結するのが好ましい。

【0062】

上記ベクターを宿主酵母に形質転換する方法は、公知の手段に従って行ってもよい。例えば、以下の方法等を用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法“Meth. Enzym., 194, p182 (1990)”、スフェロプラスト法“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, p1929 (1978)”、酢酸リチウム法“J. Bacteriology, 153, p163 (1983)”、“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, p1929 (1978)”記載の方法等をあげることができる。

より具体的には、宿主酵母を標準酵母栄養培地（例えばYEPD培地“Genetic Engineering, vol. 1, Plenum Press, New York, 117 (1979)”等）で、OD_{600nm}の値が1～6となるように培養する。この培養酵母を遠心分離して集め、洗浄し、濃度約1M～2Mのアルカリ金属イオン、好ましくはリチウムイオンで前処理する。この細胞を約30℃で、約60分間インキュベートした後、導入するDNA（約1～20 μ g）とともに約30℃で、約60分間インキュベートする。ポリエチレングリコール、好ましくは約4,000ダルトンのポリエチレングリコールを、最終濃度が約20%～50%となるように加える。約30℃で、約30分間インキュベートした後、この細胞を約42℃で約5分間加熱処理する。好ましくは、この細胞懸濁液を標準酵母栄養培地で洗浄し、所定量の新鮮な標準酵母栄養培地に入れて、約30℃で約1時間インキュベートする。インキュベート後、選択マーカーとして用いる抗生物質等を含む標準寒天培地上に植えつけ、形質転換体を取得する。

その他、一般的なクローニング技術に関しては、「モレキュラークローニング 第3版」、「Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)”等を参照した。

【0063】

形質転換の際に用いる選択マーカーとしては、醸造用酵母の場合は栄養要求性マーカーが利用できないので、G 4 1 8 耐性遺伝子 (G418^r)、銅耐性遺伝子 (CUP1) “M. Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, p 337, 1984”、セルレニン耐性遺伝子 (fas2m, PDR4) (「猪腰淳嗣ら, 生化学, 64, p 660, 1992」)、“M. Hussain et al., Gene, 101, p149, 1991”)等が利用可能である。

【0064】

本発明で育種された醸造用酵母は、酵母の増殖や発酵能においては親株を用いた場合と変化はない。したがって、原料、製造設備、製造管理等は従来法と全く同一でよい。このことは本発明の重要な特徴である。しかしながら、所望により、発酵時間などの条件を種々変化させてよいことは言うまでもない。例えば、亜硫酸排出能が増強された醸造用酵母を育種し、この酵母を用いて酒類を製造する場合は、上記のごとく排出される亜硫酸の含量のみが変化し、酵母の増殖や発酵能においては親株を用いた場合と変化はない。したがって、原料、製造設備、製造管理等は従来法と全く同一でよく、亜硫酸含量が増加し、香味の改善が得られた酒類を製造するためのコストの増加はない。

【0065】

【実施例】

以下、実施例によって本発明の詳細を述べるが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0066】

(実施例1) サッカロミセス パストリアヌス ヴァイヘンステファン 3 4 / 7 0 株 (Saccharomyces pastorianus Weihenstephan 3 4 / 7 0、以降 3 4 / 7 0 株と略す)の染色体DNA調製

染色体DNAの調製は “Yeast a practical approach (IRL PRESS) 6.2.1 (p 228-229)” に記載された方法を一部改変して行った。3 4 / 7 0 株を 2 0 0 m L の Y P D 培地 (2 % グルコース、1 % 酵母エキス、2 % ポリペプトン) に接種し、培養液の 6 6 0 n m における吸光度が 4 になるまで 3 0 °C で振とう培養した

後、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体をバッファーA (50 mM リン酸ナトリウム、25 mM EDTA、1% (v/v) β -メルカプトエタノール、pH 7.5) で洗浄した後、再度25 mLのバッファーAに懸濁し、7 mgのザイモリアーゼ-100T (生化学工業) を添加して37℃、60分間穏やかに振とうした。25 mLのバッファーB (0.2 M Tris-HCl、80 mM EDTA、1% SDS、(pH 9.5)) を加えて65℃、30分間静置した後、氷上で冷却し、12 mLの5 M 酢酸カリウムを加えて混和してさらに60分間氷上に静置した。得られた溶液を5,000 g、10分、15℃で遠心分離し、回収した上清に等容量のエタノールを添加してDNAを沈殿させ、直ちに5,000 g、10分、15℃で遠心分離して回収した。得られた沈殿物を70% (v/v) エタノールで洗浄後、自然乾燥させた後に5 mLのTEバッファー (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) に溶解し、粗DNA溶液を得た。3.5 mLの粗DNA溶液に4.06 gの塩化セシウム、840 μ gのビスベンズイミド (Hoechst33258) を加えて溶解し、100,000 g、17時間、25℃で遠心分離後、UVライトを照射してDNAバンドを可視化させ、下層のバンドを回収した。回収したDNA溶液は塩化セシウム溶液で飽和したイソプロパノールで抽出してビスベンズイミド (Hoechst33258) を除き、回収した水層に4倍容量の0.3 M 酢酸ナトリウムを加えて混和した後、3倍容量のエタノールを添加してDNAを沈殿させ、遠心分離により回収した。回収したDNAは75 μ g/mLのRNaseを含むTEバッファーに溶解し、37℃で5分間保持した後、フェノール/クロロホルム抽出を3回繰り返し、回収した水層から再びエタノール沈殿によって精製した。遠心分離で回収した沈殿を70% (v/v) エタノールで洗浄後に自然乾燥し、TEバッファーに溶解して染色体DNA溶液を調製した。

【0067】

(実施例2) ショットガンライブラリーの作製

実施例1で調製した34/70株のゲノム溶液を、TEバッファーを用いて1 mg/mLの濃度に調製し、その0.1 mLをHydroshear (ジンマシーンズ社製、speed6、cycle20) で処理することにより、ゲノムDNAを断片化した。DNA

ブランディングキット (DNA Blunting kit、宝酒造社製) を用いて、ゲノム断片の末端を平滑化したのち、0.8%アガロース電気泳動により分画し、1.5~2.5 kb のゲノム断片をゲルから切り出しDNAを溶出した。DNA溶出液をフェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿しゲノムライブラリーインサートを得た。T4リガーゼ (宝酒造社製) を用いて、上記インサート全量とpUC18 SmaI/BAP (Amersham Biosciences社製) 500 ng とを15℃で、15時間ライゲーションした。

ライゲーション反応物をエタノール沈殿し、0.01 mL のTEバッファーに溶解した。大腸菌ELECTRO CELL DH5 α (宝酒造社製) 0.04 mL に対して0.001 mL のライゲーション溶液を、添付実験マニュアルに示された条件で、エレクトロポレーションにより導入した。これを0.1 mg/mL アンピシリン、0.1 mg/mL X-gal、1 mmol/L イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を含むLB平板培地〔寒天を1.6%含むLB培地 (10 g/L バクトトリプトン、5 g/L 酵母エキス、10 g/L 塩化ナトリウム、pH 7.0)〕に塗布し、37℃終夜培養した。

該平板培地上に形成されたコロニーより得られた形質転換体を、0.1 mg/mL アンピシリンを含むLB培地0.05 mL を添加した384穴タイタープレート中で、37℃終夜静置培養した後、50%グリセロール水溶液を0.05 mL 加え、攪拌してグリセロールストックとして用いた。

【0068】

(実施例3) コスミドライブラリーの作製

(実施例1) で得られた34/70株ゲノムDNA約0.1 mg をSau3AI (宝酒造社製) で部分消化した。この断片のSuper Cos Iベクター (ストラタジーン社製) のBamHI部位への挿入は、マニュアルに従って行った。この方法により得られた連結産物は、Gigapack III Gold (ストラタジーン社製) を用いてパッケージングを行い、マニュアルに従い、大腸菌XL1-Blue MR株 (ストラタジーン社製) 株に導入した。これをアンピシリン0.1 mg/mL を含むLB平板培地に塗布し、37℃で終夜培養した。得られたコロニーは、96穴タイタープレートで0.1 mg/mL アンピシリンを含むLB培地 (各ウェル0.05 mL

L) で 37℃ 終夜培養した後、50%グリセロールを含むLB培地 0.05 mL を加え、攪拌してグリセロールストックとした。

【0069】

(実施例 4) 塩基配列の決定

(4-1) DNA断片の調製

34/70株ゲノムの全塩基配列を、全ゲノムショットガン法を基本にして決定した。該方法で塩基配列を決定するDNA断片は、上記実施例2で調製したライブラリーよりPCR法を用いて調製した。具体的には、0.1 mg/mLアンピシリンを含むLB培地をウェルあたり0.05 mLずつ分注した384穴タイタープレートに全ゲノムショットガンライブラリー由来クローンをレプリケーター(ジンソーリューション社製)で植菌し、37℃で終夜静置培養を行った。該培養液を、0.01 mLのPCR用反応液[TaKaRa Ex Taq(宝酒造社製)]を含む384穴リアクションプレート(AB gene社製)に、レプリケーター(ジンソーリューション社製)を用いて移し、GeneAmp PCR System9700(アプライドバイオシステムズ社製)を用い、牧野らのプロトコール“DNA Research, 5, p1-9 (1998)”に従ってPCRを行い、挿入断片の増幅を行った。その後、PCR産物精製用キット(アマシャムバイオサイエンス社製)により余剰プライマーおよびヌクレオチドの除去を行い、この試料を用いてシーケンス反応を行った。

【0070】

上記実施例3のコスミドライブラリーからのDNA断片は以下の方法で調製した。アンピシリン 0.05 mg/mLを含む2×YT培地(16 g/Lバクトトリプトン、10 g/L酵母エキス、5 g/L塩化ナトリウム、pH 7.0)を1.0 mLずつ分注した96穴プレートの各ウェルに、全コスミドライブラリー由来クローンを植菌し、30℃で終夜振とう培養を行った。該培養液より、プラスミド自動調製機KURABO PI-1100(倉敷紡績社製)を用い、倉敷紡績社のマニュアルに従って、コスミドDNAを調製し、これをシーケンス反応のDNA断片として用いた。

【0071】

(4-2)シーケンス反応

2 μ L の DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit (アマシャムバイオサイエンス社製) に対し、ショットガン DNA のシーケンス反应用プライマー対として M13_{-for} (配列番号: 5) / M13_{-rv} (配列番号: 6) “DNA Research, 5, p1-9 (1998)” を、コスミド DNA のシーケンス反应用プライマー対として SS-cosF.1 (配列番号: 7) / SS-cosR.1 (配列番号: 8) を使用し、上記 (4-1) で調製した DNA 断片 (PCR 産物又はコスミド DNA) を混ぜて 8 μ L のシーケンス反応液とした。プライマーおよび DNA 断片の量は各々 3.2 pmol および 50 ~ 200 ng である。該反応液を用い、GeneAmp PCR System9700 で 60 サイクルのダイターミネーターシーケンス反応を行った。サイクルパラメーターは DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit に付属するマニュアルに従った。サンプルの精製は MultiScreen HV plate (ミリポア社製) を用い、ミリポア社のマニュアルに従って行った。精製された反応物は 4℃ の暗所で保存した。MegaBACE1000 Sequencing System (アマシャムバイオサイエンス社製) および ABI PRISM 3700 DNA Analyser (アプライドバイオシステムズ社製) を用い、付属のマニュアルに従い、該乾燥反応物を分析した。MegaBACE1000 Sequencing System で得られた 332, 592 配列と 3700 DNA Analyser で得られた 13, 461 配列のデータは、サーバー Enterprise6500 (サンマイクロシステムズ社製) へ転送し、保存した。346, 053 配列分のデータはゲノムサイズの約 7 倍に相当した。

尚、実施例で用いる PCR 用プライマーの一覧を表 3 に示す。

【0072】

(実施例 5) アセンブリ (塩基配列断片を整列して重ね合わせ、連結する作業)

上記実施例 4 で得られた 346, 053 配列の DNA 断片のシーケンスデータからゲノム塩基配列の再構築の全作業は UNIX (登録商標) プラットフォーム上で行った。ベースコールを phred (The University of Washington)、ベクター配列の除去を Cross_Match (The University of Washington)、アセンブリを Phrap (The University of Washington) で行った。アセンブリの結果得られるコンティグはグラフィカルエディター consed (The University of Washington) を用いて解析した。ベースコールからアセンブリまでの一連の作業は consed に付属するスクリプト phredPhrap を利用することで一括して行った。

【0073】

(実施例6) *S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との比較データベース作成

*S. pastorianus*は、*S. cerevisiae*とその近縁種との自然交雑体であると考えられている“Int. J. Syst Bacteriol.、35、p508-511 (1985)”。そこで、(4-2)で得られたコスミドDNAクローンの両端塩基配列(10, 044塩基配列)を*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列に対しての相同性検索アルゴリズムによる相同性検索を行うことにより、各塩基配列について、*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列上での相同領域の特定とその同一性を決定し、データベースを作成した。コスミド塩基配列について対応する*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との同一性分布図を図2に示す。コスミドの塩基配列は、*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列と96%より高い同一性を示す塩基配列群と約84%前後の同一性を示す塩基配列群に大別された。96%より高い同一性を示す塩基配列は*S. cerevisiae*由来Sc型の塩基配列、約84%前後の同一性を示す塩基配列群は近縁種ゲノム由来非Sc型の塩基配列とした。同様に(4-1)で得られたショットガンクローン両端塩基配列と*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との比較データベースを作成した(表1)。表1は、3, 648コスミドクローンの両端塩基配列と*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との比較データベースの例を示す表である。塩基配列決定を行ったコスミドのフォワード鎖、リバーサ鎖それぞれの*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列上での相同領域とその同一性を示す。

【0074】

【表 1】

コスミド名	フォワード鎖						リバース鎖					
	マッピングした <i>S. cerevisiae</i> ゲノム塩基配列情報			マッピングした <i>S. cerevisiae</i> ゲノム塩基配列情報			マッピングした <i>S. cerevisiae</i> ゲノム塩基配列情報			マッピングした <i>S. cerevisiae</i> ゲノム塩基配列情報		
	配列長 (塩基)	一致長 (塩基)	染色体 番号	開始位置 (塩基)	終了位置 (塩基)	同一性 (%)	配列長 (塩基)	一致長 (塩基)	染色体 番号	開始位置 (塩基)	終了位置 (塩基)	同一性 (%)
SSL052 A06	627	625	XVI	15,940	16,565	98.7	626	625	XVI	52,979	52,354	98.7
SSL023 D02	346	341	XVI	16,784	17,125	87.3	633	629	XVI	66,017	65,388	90.5
SSL015 E09	630	625	XVI	39,030	39,655	89.5	615	614	XVI	81,655	81,041	97.9
SSL029 B08	664	660	XVI	45,916	45,256	99.3	650	647	XVI	8,504	9,151	98.8
SSL028 G10	656	655	XVI	47,609	46,954	98.3	646	641	XVI	10,359	11,000	98.0
SSL008 E01	622	620	XVI	46,362	46,982	93.4	589	587	XVI	86,022	85,435	98.3
SSL030 G05	632	631	XVI	47,013	47,644	99.2	618	617	XVI	87,004	86,387	99.5
SSL032 H10	646	645	XVI	52,076	51,431	98.1	637	636	XVI	13,273	13,909	98.7
SSL041 G05	635	634	XVI	52,979	52,345	99.4	619	618	XVI	9,825	10,443	99.4
SSL031 D08	659	658	XVI	52,297	52,955	99.2	638	637	XVI	92,295	91,658	99.1
SSL069 F11	417	414	XVI	55,053	55,467	88.5	788	787	XVI	97,115	96,328	94.4
SSL005 A10	647	645	XVI	65,233	64,588	99.2	527	516	XVI	21,537	22,053	81.8
SSL014 G07	628	627	XVI	65,229	65,856	99.8	621	620	XVI	103,674	103,054	99.2

【0075】

作成した比較データベースで得られた情報を基にコスミドクローン、ショットガンクローンのサッカロミセス *S. cerevisiae* ゲノム塩基配列上へのマッピング

を行った(図3)。また、実施例5で得られたコンティグ塩基配列と*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列との比較データベース作成(表1)を行い、マッピングを行った。マッピング手法は上記に述べた方法とほぼ同様であるが、コスミド、ショットガンクローンのフォワード鎖、リバーズ鎖が異なるコンティグ内に存在する場合、これらのコンティグ間を連結させた(図4)。

【0076】

(実施例7) ORFの同定と機能推定

実施例5でアセンブリした塩基配列中のORF(Open Reading Frame)同定を行った。実施例を具体的に下記に示す。開始コドンから終始コドンまで300塩基配列以上の長さを持つ配列を相補鎖も含めて6種類の読み枠についてORFを同定する市販のプログラムを用い、実施例5でアセンブリした塩基配列中に存在するORFの同定を行った。抽出したORFの機能推定は、SGDに登録され、公開されている*S. cerevisiae*のORFのアミノ酸配列を相同性検索することにより行った。SGDに相同性があるORFがない場合には、ORFのアミノ酸配列をGenBankデータベース由来のタンパク質コード領域からなるデータベースである、nr、SWISSPROT等のアミノ酸データベースに対して、BLASTを用いた相同性検索することにより行った(表2)。表2は、非Sc型ゲノム中に存在するORFの機能予測結果に対応する*S. cerevisiae*のORF名の例を示す表である。左から順に、ビール酵母ゲノム塩基配列に存在するORF名、ポリヌクレオチドでのORF長、ポリペプチドでのORF長、相同性検索により決定された*S. cerevisiae*のORF名、同一性、一致長及び遺伝子の機能を示す。

【0077】

【表 2】

ORF名	ORF長 (bp)	ORF長 (aa)	相同遺伝 子名	同一性 (%)	一致長 (aa)	機能
nonSc-ATF2	1638	545	ATF2	71	535	alcohol O-acetyltransferase
nonSc-THI3	1305	434	THI3	94	431	transcriptional activator
nonSc-FUS3	435	144	FUS3	90	139	MAP kinase
nonSc-ILV5	1188	395	ILV5	97	395	ketol-acid reductoisomerase
nonSc-MET2	1461	486	MET2	93	486	homoserine O-acetyltransferase
nonSc-MET10	3108	1035	MET10	87	1035	sulfite reductase (NADPH)
nonSc-MET14	609	202	MET14	97	202	adenylsulfate kinase
nonSc-MET16	786	261	MET16	92	261	phosphoadenylyl-sulfate reductase
nonSc-TPH1	747	248	TPH1	96	248	triosephosphate isomerase
nonSc-MET3	1536	511	MET3	94	511	sulfate adenylyltransferase (ATP)
nonSc-MET10	3108	1035	MET10	87	1035	sulfite reductase (NADPH)
nonSc-SAM1	1149	382	SAM1	97	382	methionine adenosyltransferase
nonSc-SSU1	1377	458	SSU1	78	457	sulfite transporter

【0078】

(実施例 8) DNA マイクロアレイと PCR による染色体構造の解析

酵母からのゲノム DNA の調製は QIAGEN Genomic Tip 100/G (#10243) および QIAGEN Genomic DNA buffer set (#19060) を用いて、キットに添付のマニュアル

に従って行った。このDNA 10 μ gをWinzelerらの方法“Science 281 1194-1197, (1998)”に従ってDNaseI（インビトロジェン社製）で消化し、ターミナルトランスフェラーゼ（ロッシュ社製）でビオチン化して、DNAマイクロアレイ（Affymetrix Gene Chip Yeast Genome S98 Array）にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションおよびアレイの輝度の検出はAffymetrix社製 Gene Chip解析基本システムを用いて行った。

S. cerevisiae S 288 C株と34/70株のそれぞれから得たプローブの輝度を発現解析用ソフト（マイクロアレイスイート5.0）を用いて比較し、輝度の差を*S. cerevisiae* S 288 C株を基準としたシグナル比(Signal log ratio)として算出した。次に各プローブのシグナル比を表計算ソフト（マイクロソフトExcel2000）を用いて各染色体ごとに整列させ、シグナル比を棒グラフで表すと、図5に示すようにシグナル比の値が大きく変化する箇所がいくつかの染色体で認められた。この実験で用いられているハイブリダイゼーションの条件では、34/70株ゲノムの中で、*S. cerevisiae*と100%近い同一性を示すSc型の遺伝子のみがハイブリダイズするために、34/70株ゲノム中のSc型遺伝子の数が変化することでシグナル比の変化が生じたと考えられ、シグナル比の値が大きく変化する箇所では、Sc型配列からなるSc型染色体から非Sc型配列からなる非Sc型染色体（あるいはその逆）へのキメラ染色体構造の存在が示唆された。

このキメラ染色体構造を、ショットガン法により決定した34/70株のゲノム塩基配列を基に、片側がSc型、反対側が非Sc型の塩基配列であるプライマーを2組（XVI-1(L)cer-95894（配列番号：9）/ XVI-1(R)nonSc-106302rv（配列番号：10）、XVI-2(L)cer-859737（配列番号：11）/ XVI-2(R)nonSc-864595rv（配列番号：12））設計し、34/70株由来のゲノムDNAをDNA断片としてPCRによって確認した。以下、16番染色体の2箇所についての例を述べる。

PCRは、TAKARA LA TaqTMと添付のバッファーを用い、添付のマニュアルに従い、TAKARA PCR Thermal Cycler SPを用いて反応を行った。

【0079】

PCRの結果、34/70株からは、予想される長さのDNA断片が増幅されたことが0.8%アガロース電気泳動で確認されたが、PCRのDNA断片として実験室株*S. cerevisiae*X2180-1AのゲノムDNAを用いた場合にはDNA断片の増幅は認められなかった。さらに34/70株から増幅されたDNA断片の両端の塩基配列を確認したところ、確かにショットガン法により決定したゲノム塩基配列と一致していることが明らかとなり、その領域内においてSc型染色体と非Sc型染色体の連結（乗換え）が生じていることが確認された。

以上の結果から16番染色体には、図6に示すように少なくとも2種類の染色体が存在すると考えられた。同様の手法を用いて、Sc型染色体と非Sc型染色体（あるいはその逆）との連結、つまりキメラ染色体構造の存在が示唆される領域に関して確認を行った。このようなSc型染色体と非Sc型染色体のキメラ染色体構造は、34/70株全染色体中では少なくとも13箇所確認された（図1）。

ゲノム情報を利用することによって、下面ビール酵母の複雑な染色体構造が明らかとなり、34/70株には少なくとも37種類以上の染色体が存在することが明らかとなった。

【0080】

（実施例9）34/70株のSSU1遺伝子のクローニング

実施例6で得られた比較データベースを用いて、非Sc型SSU1遺伝子を含むクローンを検索し、ショットガンクローンのフォワード塩基配列、リバーズ塩基配列と*S. cerevisiae*との相同性がそれぞれ62.9%、82.9%で、位置情報より完全長の非Sc型SSU1構造遺伝子を含む約2.4kbの断片が挿入されたショットガンクローンSSS103_G08を取得した。

これを染色体DNAのライブラリーから選択し、PCR法によって非Sc型SSU1遺伝子の全長を取得した。プライマーとしてSacI-nonSc-SSU1_for1（配列番号：13）、およびBglIII-nonSc-SSU1_rv1460（配列番号：14）の合成DNAを用いた。この組み合わせによって非Sc型SSU1遺伝子の塩基番号1～1460が増幅され、約1.5kbのSacI-BglIII断片が得られた。

Sc型SSU1遺伝子については、30/70株の染色体DNAをテンプレ

トとし、SGDの情報を元に設計したプライマー対を用いたPCRで構造遺伝子の全長を取得した。プライマーにはSacI-ScSSU1_for1 (配列番号: 15)、およびBglIII-ScSSU1_rv1406 (配列番号: 16) の合成DNAを用いた。この組み合わせによってSc型SSU1遺伝子の塩基番号1~1406が増幅され、約1.4 kbのSacI-BglIII断片が得られた。

上記のようにして得られたSc型SSU1および非Sc型SSU1遺伝子断片を、TA cloningキット(Invitrogen)によってキットに添付のpCR 2.1-TOPOベクターに挿入し、これらをそれぞれTOPO/ScSSU1およびTOPO/nonSc-SSU1とした。得られたSc型SSU1および非Sc型SSU1遺伝子の塩基配列は、サンガーの方法“F. Sanger, Science, 214, p1215, 1981”で調べた(図10)。

【0081】

(実施例10) 各SSU1遺伝子の破壊

文献“Goldstein et al., yeast. 15 1541 (1999)”に記載の方法に従い、薬剤耐性マーカーを含むプラスミド(pFA6a (G418^r), pAG25 (nat1)) をテンプレートとしたPCRによって遺伝子破壊用断片を作製した。PCR用のプライマーとして、非Sc型SSU1遺伝子破壊にはnonSc-SSU1_for (配列番号: 17) / nonSc-SSU1_rv (配列番号: 18) を、Sc型SSU1遺伝子破壊にはScSSU1_for (配列番号: 19) / ScSSU1_rv (配列番号: 20) を用いた。非Sc型SSU1遺伝子の破壊にはさらにプラスミドpPGAPUR (AUR1-C) およびプライマーnonSc-SSU1_for+pGAPUR (配列番号: 21) / nonSc-SSU1_rv+AUR1-C (配列番号: 22) を用いた。このようにしてSc型SSU1破壊用DNA断片2種類、非Sc型SSU1破壊用DNA断片3種類を作製した。

上述の方法で作製した遺伝子破壊用断片で下面ビール酵母BH96株を形質転換した。形質転換は特開平07-303475号公報に記載された方法で行い、選択薬剤の濃度はそれぞれkanamycin 300 mg/L、nourseothricin 50 mg/L、aureobasidin 1 mg/Lとした。

ここで得られた形質転換体について、それぞれ用いた薬剤耐性マーカーが導入されかつ各SSU1遺伝子が破壊されていることをSouthern解析によって確認した。まず、親株および形質転換体から抽出した染色体DNAを、Sc型SSU1

遺伝子破壊確認にはNcoIで、非Sc型SSU1遺伝子破壊確認にはHindIIIで制限酵素処理（37℃、8hrs）し、これを1.5%アガロースゲル電気泳動で展開後、メンブレンにトランスファーした。以下はAlkphos Direct Labelling Reagents (Amersham) のプロトコールにしたがって、Sc型SSU1あるいは非Sc型SSU1に特異的なプローブとハイブリダイズ（55℃、18hrs）させ、CDP-Starでシグナルを検出した。

このようにして遺伝子破壊が確認できた株を、それぞれ

Sc-1 (ScSSU1/Scssul::G418^r)

Sc-2 (Scssul::G418^r/Scssul::nat)

nonSc-1 (nonSc-SSU1/nonSc-SSU1/nonSc-SSU1::G418^r)

nonSc-2 (nonSc-SSU1/nonSc-SSU1::G418^r/nonSc-SSU1::nat)

nonSc-3 (nonSc-SSU1::G418^r/nonSc-SSU1::nat/nonSc-SSU1::AUR1-C)

と命名した。

【0082】

(実施例11) ビール試験醸造における亜硫酸生成量の解析

親株ならびに実施例10で得られた遺伝子破壊株 Sc-1～nonSc-3を用いた発酵試験を以下の条件で行った。

麦汁エキス濃度	12.75%
麦汁容量	2L
麦汁溶存酸素濃度	約9ppm
発酵温度	15℃一定
酵母投入量	10g 湿酵母菌体 / 2L麦汁

発酵液を経時的にサンプリングし、酵母増殖量（OD600）（図7-a）、エキス消費量（図7-b）、亜硫酸量（図7-c）の経時変化を調べた。亜硫酸の定量は、酸性下で蒸留により亜硫酸を過酸化水素水に捕集した後、アルカリで滴定することによって行った（（財）日本醸造協会 改訂BCOJビール分析法）。

この結果、Sc型SSU1破壊株では親株と同程度の亜硫酸生成量であったのに対し、非Sc型SSU1破壊株では著しく低下していることが分かった。このことから、亜硫酸生成において下面ビール酵母特有の遺伝子非Sc型SSU1が

大きく寄与していることが示唆された。

またこのとき、非 S c 型 S S U 1 破壊株では増殖速度およびエクス消費速度が著しく低下しており、亜硫酸排出能を欠落させることによって細胞内に過剰の亜硫酸が蓄積し、生育を阻害するという考えを支持する結果が得られた。

【 0 0 8 3 】

(実施例 1 2) 各 S S U 1 遺伝子の構成的発現

実施例 9 記載のプラスミド TOP0/nonSc-SSU1 から制限酵素 (SacI-BglII) 処理によって非 S c 型 S S U 1 遺伝子全長を含む約 1. 5 k b の断片を切り出した。これを同様に制限酵素 (SacI-BglII) 処理したプラスミド pNI-NUT に挿入し、非 S c 型 S S U 1 構成的発現ベクター pYI-nonSc-SSU1 を構築した。ベクター pNI-NUT は酵母染色体相同組換え部位として U R A 3、形質転換マーカーとして nourseothricin 耐性遺伝子 (nat1) およびアンピシリン耐性遺伝子 (Amp^r) を含んでいる。一方、S c 型 S S U 1 構成的発現ベクター pNI-SSU1 は、上記 pYI-nonSc-SSU1 の非 S c 型 S S U 1 部分を、約 2 k b の *S. cerevisiae* 由来の SSU1-R “J. Ferment. Bioeng., 86, p 427, (1998)” で置換した構造である。ここで導入した各 S S U 1 遺伝子の構成的発現には、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子 (T D H 3) のプロモーターおよびターミネーターを用いた。

上述の方法で作製した構成的発現ベクターで下面ビール酵母 B H 2 2 5 株を形質転換した。形質転換は特開平 0 7 - 3 0 3 4 7 5 号公報に記載された方法で行い、nourseothricin 5 0 m g / L を含む Y P D 平板培地で選択した。

構成的発現の確認は R T - P C R によって行った。total RNA の抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使い、for total RNA isolation from yeast のマニュアルにしたがって行った。S c 型 S S U 1 特異的プライマーには ScSSU1_for331 (配列番号: 2 3) / ScSSU1_982rv (配列番号: 2 4)、非 S c 型 S S U 1 特異的プライマーには nonSc-SSU1_for329 (配列番号: 2 5) / nonSc-SSU1_981rv (配列番号: 2 6)、内部標準には構成的発現遺伝子 P D A 1 の特異的プライマーである PDA1_for1 (配列番号: 2 7) / PDA1_730rv (配列番号: 2 8) を用いた。P C R 産物を 1. 2 % アガロース電気泳動で展開後、エチジウムブロマイド溶液

で染色し、各SSU1遺伝子のシグナル値をPDA1のシグナル値で標準化して親株のそれと比較した。こうして確認された構成的発現株をSc型SSU1高発現株、非Sc型SSU1高発現株と命名した。

【0084】

(実施例13) ビール試験醸造における亜硫酸排出量の解析

親株並びに実施例12で得られた各SSU1構成的発現株を用いた発酵試験を以下の条件で行った。

麦汁エキス濃度	12.83%
麦汁容量	2L
麦汁溶存酸素濃度	約9ppm
発酵温度	12℃一定
酵母投入量	10g湿酵母菌体 / 2L麦汁

実施例11と同様に、発酵液を経時的にサンプリングし、酵母増殖量(OD600)(図8-a)、エキス消費量(図8-b)、亜硫酸量(図8-c)の経時変化を調べた。亜硫酸生成量は、Sc型SSU1高発現株(発酵終了時において19ppm)は親株(同12ppm)より若干高い程度であったのに対して、非Sc型SSU1高発現株では著しい増大(同45ppm)がみられた。またこのとき、親株と構成的発現株の間で、増殖速度およびエキス消費速度には差がみられなかった。

以上の結果から、本発明によって開示された下面ビール酵母特有の亜硫酸排出ポンプを構成的に発現させて、亜硫酸のビール中への排出能が強化された酵母では、発酵工程や発酵期間を変えることなく、ビールの抗酸化剤として作用する亜硫酸の排出量を特異的に増加させることが可能となった。これによって香味安定性に優れ、より品質保持期間の長い酒類を製造することが可能となった。

【0085】

(実施例14) 34/70株のMET14遺伝子のクローニング

実施例6で得られた比較データベースを用いて、下面ビール酵母特有のアデニリル硫酸キナーゼ非Sc型MET14遺伝子を含むクローンを検索し、ショットガンクローンのフォワード塩基配列、リバース塩基配列と*S. cerevisiae*との相

同性がそれぞれ 7 9 . 0 %、5 6 . 0 %で、位置情報より完全長の非 S c 型 M E T 1 4 構造遺伝子を含む約 1 . 9 k b の断片が挿入されたショットガンクローン SSS134_021を取得した。

これを染色体 D N A のライブラリーから選択し、P C R によって非 S c 型 M E T 1 4 遺伝子の全長を取得した。プライマーとして、表 3 に示す SacI-nonSc-MET14_for-21（配列番号：2 9）、および BamHI-nonSc-MET14_rv618（配列番号：3 0）の合成 D N A を用いた。この組み合わせによって約 0 . 6 k b の非 S c 型 M E T 1 4 遺伝子 SacI-BamHI断片が得られた。

【 0 0 8 6 】

【表 3】

配列番号	配列名	5'-塩基配列-3'
5	M13_for	agtcacgacg ttgla
6	M13_rv	caggaaacag ctatgac
7	SS-cosF.1	aggcgatca cgaggccctt tc
8	SS-cosR.1	cttatcgatg ataagcggtc aaacatgag
9	XVI-1(L)cer-95894	cgcaagctcc gtacgttcaa cattcttatg aacggc
10	XVI-1(R)nonSc-106302rv	gcatcatcgt cgtgatcctt ctttggcaaa tgcagg
11	XVI-2(L)cer-859737	gcggglatit lgtatgglaaa tctacaagcc ctgcgc
12	XVI-2(R)nonSc-864595rv	cccagacaca gtttccagta tcatcctcgc agaac
13	SacI-nonScSSU1_for1	gagctcatgg tgcctagttg gatgct
14	BglII-nonScSSU1_rv1460	agatctcagc ttcagcccaa tccatt
15	SacI-ScSSU1_for1	gagctcatgg ttgccaatig ggtact
16	BglII-ScSSU1_rv1406	agatctctcc tacaigaaat gcttgc
17	nonScSSU1_for	atggtcgcta gtggatgct cactgccaca agggatttca acctttcat atcgaatatt ctgtacagct gtttgcattg gttatggggg tgggtatttc ccttgacagt cttgacgtgc
18	nonScSSU1_rv	tgttaaatat gtactatcga tagccgagtt tgaattctcc acattttcga acagcttctt cgttcccttc ctttgataaa tgctgttgaa aggagaattg cgcacttaac ttgcgactcg
19	ScSSU1_for	atggttgcca attgggtact tgcctttacg aggcagtttg acctttcat gtttatgatt gtcattgggtg tggcatttcc atcgaatatt ctatatagct ccttgacagt cttgacgtgc
20	ScSSU1_rv	ttatgtctaaa cgcgtaaaaat cttagagccga gtttgattct ttccagcttt caatgctggt atacggagaa actgtgctct tttccgtacc tgactctgaa cgcacttaac ttgcgactcg
21	nonScSSU1_for+pGAPUR	atggtcgcta gtggatgct cactgccaca agggatttca acctttcat gtttgcattg gttatggggg tgggtatttc atcgaatatt ctgtacagct cgggagctta ccagttctca
22	nonScSSU1_rv+AURI-C	tgttaaatat gtactatcga tagccgagtt tgaattctcc acattttcga tgcgttgaa aggagaattg acagcttctt cgttcccttc ctttgataaa tgcactctag aggalccaga
23	ScSSU1_for331	tcgaaagcga acacgacgaa
24	ScSSU1_982rv	cgacagaaat cacggtgaaa a
25	nonScSSU1_329	tgtcacaaaa attaccacg ac
26	nonScSSU1_981rv	aagggaatt accgtaaaga ag
27	PDA1_for1	atgtttgtcg caccgtatc t
28	PDA1_730rv	gattagaggc accatcac
29	SacI-nonSc-MET14_for-21	ctcgagctct cgtgaaattc attgaaacaa atg
30	BamHI-nonSc-MET14_rv618	ggaaccttat aagatttata gatgcttccg
31	SacI-ScMET14_for	ctcgagctca gaaaagttgg aattatttct cca
32	BamHI-ScMET14_rv	ggaaccaatg tacagtaatc ggtcaaattt

【0087】

Sc型MET14遺伝子については、34/70株の染色体DNAをテンプレートとし、SGDの情報を元に設計したプライマー対を用いたPCRで構造遺伝子の全長を取得した。プライマーにはSacI-ScMET14_for（配列番号：31）、およびBamHI-ScMET14_rv（配列番号：32）の合成DNAを用いた。この組み合わせによって約0.6kbのSc型MET14遺伝子の塩基番号1～609が増幅され、約0.6kbのSacI-BamHI断片が得られた。

上記のようにして得られたSc型MET14および非Sc型MET14遺伝子

断片を、TA cloningキット(Invitrogen)によってキットに添付のpCR 2.1-TOPOベクターに挿入し、これらをそれぞれTOPO/ScMET14およびTOPO/nonSc-MET14とした。

得られたSc型MET14および非Sc型MET14遺伝子の塩基配列は、サンガーの方法“Science, 214, p1215 (1981)”で調べた(図11)。

【0088】

(実施例15) Sc型MET14構成的発現株における各MET14遺伝子の構成的発現

実施例14記載のSc型MET14および非Sc型MET14の構造遺伝子を含む約0.6kbの断片を構成的発現ベクターpUP3GLP(特開2000-316559)のマルチクローニングサイトに挿入し、各MET14遺伝子がグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターおよびターミネーターで発現されるような、構成的発現ベクターpUP3ScMET14、pUP3nonSc-MET14を構築した。一方、実施例12記載のSc型SSU1構成的発現ベクターpNI-SSU1で上面ビール酵母KN009F株を形質転換し、Sc型SSU1構成的発現株FOY227株を作製した。このFOY227株を上述のpUP3ScMET14、pUP3nonSc-MET14で形質転換し、Sc型SSU1構成的発現株におけるSc型MET14遺伝子構成的発現株FOY306株、非Sc型MET14遺伝子構成的発現株FOY307株を作製した。

【0089】

(実施例16) ビール試験醸造における亜硫酸排出量の解析

実施例15で得られたSc型SSU1構成的発現株FOY227株、Sc型SSU1構成的発現株におけるSc型MET14遺伝子構成的発現株FOY306株、非Sc型MET14遺伝子構成的発現株FOY307株および親株KN009F株を用いた発酵試験を以下の条件で行った。

麦汁エキス濃度	12.84%
麦汁容量	1.5L
麦汁溶存酸素濃度	約9ppm
発酵温度	25℃一定

酵母投入量

7.5 g 湿酵母菌体 / 1.5 L 麦汁

実施例 11 と同様に、発酵液を経時的にサンプリングし、酵母増殖量 (OD 600)、エキス消費量、亜硫酸量の経時変化を調べた。酵母増殖量、エキス消費量には各株間で差が認められなかったが、亜硫酸生成量は、図 9 に示すように、親株 (KN009F) が殆ど亜硫酸を生成しない (発酵終了時において 0.32 ppm) のに対し、Sc 型 SSU1 構成的発現株 FOY227 株では僅かに生成量が増加 (同 3.4 ppm) しており、これに更に Sc 型 MET14 を構成的に発現させた株 FOY306 株では、若干増加が認められ (同 6.4 ppm) 非 Sc 型 MET14 構成的発現株では著しい増大 (同 16.6 ppm) が認められた。

【0090】

以上の結果から、本発明によって開示された下面ビール酵母特有のアデニリル硫酸キナーゼを構成的に発現させて、亜硫酸の生成能が強化された酵母では、発酵工程や発酵期間を変えることなく、ビールの抗酸化剤として作用する亜硫酸の排出量を特異的に増加させることが可能となった。これによって香味安定性に優れ、より品質保持期間の長い酒類を製造することが可能となった。

【0091】

【発明の効果】

工業用酵母、特にビール等の酒類の製造に用いられる醸造用酵母の全ゲノム塩基配列データベースを作製し、そのデータベースを基に、醸造用酵母が特異的に有する醸造特性に関わる遺伝子を選択し、その遺伝子の機能解析を行い、その遺伝子を破壊したり又は、高発現させることにより、目的とする醸造特性に関わる遺伝子を選択することができる。また当該遺伝子を利用して、当該遺伝子の発現を制御することにより、当該遺伝子に関わる醸造特性を発揮する酵母を育種し、この酵母を用いて生産性や品質を向上させたアルコール又は酒類、例えば製品中で抗酸化作用をもつ亜硫酸含量が高く、香味安定性に優れ、より品質保持期間の長い酒類を製造することが可能となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> サントリー株式会社

<120> 醸造用酵母遺伝子のスクリーニング法

<130> S07J1000

<160> 32

<210> 1

<211> 1377

<212> DNA

<213> *Saccharomyces* sp.

<400> 1

```
atggtcgcta gttggatgct cactgccaca agggatttca accctttcat gtttgtcatg 60
gttatggggg tcggtatttc atcgaatatt ctgtacagct tcccgtatcc ggcgaggtgg 120
ctgaggatat gctcgtacat catgtttgcc attacatgtt tgattttcat ctctgtacag 180
gcgctgcagc ttttgcacat ggtcatctat atcaaagaaa aaagctttag agattacttc 240
aatgaatatt tcagaagtct gaagtacaat ttattttggg gtacttatcc catgggatta 300
gtaacaatca taaatTTTTT gggggcgctg tcacaaaaat ttaccacgac aagccctgcg 360
aatgccaagc acttgatcat ttttgtttac gtcctgtggg ggtatgacct cgcggtttgt 420
ttagtaaccg cttgggggat ttcattcctc atctggcaaa agtactactt cgtggacggg 480
gttggaatc actcttcata cagttcacga atggcttccg accacatgaa aagcgactg 540
ttgctagata tcattccgct ggtcgttggt gcttcgagcg gtgggacatt tacaatgtca 600
aaaatattcg gtaccacttt tgataggaat attcaattgc taacactggg catctgtgcc 660
ctggtttggc tacacgctct tatatttggtc tttattctga ttacaatata cttctggaat 720
ctttacatca ataagatacc accaatgacg caggtattta cgttggttctt ggtattgggg 780
ccattgggcc aaggaagttt tggtattttg ttgcttactg acaatataag aaagtatgta 840
gaaaaatact acccaaggga aaacatcacc atggaacaag aaatactaac cattatggtt 900
ccgtggtgtt tcaaggttct gggcatgaca tttgctttgg cattaatcgc tatgggttac 960
ttctttacgg taatttcctt tatttcgatt ttatcatact acaatgaaag agttgttgac 1020
```

aatgaaacag gcaaagtga aaggatctac actttccata aaggtttctg ggggatgact 1080
ttcccgatgg gtacatgtc tttgggaaac gaggagctgt atctgcaata caaccagtat 1140
gttccttat atgcattcag agtcatagct accatatatg gtggtatttg tgtttgctgg 1200
tcaatcttat gcctctcgtg cacgttgat ggttacctga aaacgattct ccatgctgcc 1260
cgtaaaccctt cgtttttatc agaggaaggg acggagaaga ctgtcaattc tcctttcaac 1320
agcatcgaaa gtgtggagga atcaaactcg gctatcgata gtacatattt aacataa 1377

<210> 2

<211> 609

<212> DNA

<213> Saccharomyces sp.

<400> 2

atggctacta atatcacttg gcatccaaat cttacctacg acgaacgtaa ggaattaaga 60
aagcaagacg gctgtaccgt ttggttgacc ggtctaagtg cgtcaggaaa aagtacaata 120
gcttgtgcac tggaacaatt actgcttcaa aaaaacttat ctgcttatag gttagatggg 180
gataacattc gttttggttt gaataaggat ttgggcttct cagaaaagga cagaaatgaa 240
aacattcgta gaattagtga agtatccaag ctattcgctg attcgtgtgc tgtatccatc 300
acttcattta tttcccata cagagtcgat agagacagag cccgtgattt acataaggaa 360
gcaggcttga agttcattga aatTTTTgtt gatgttccat tagaagtcgc tgagcaaaga 420
gaccctaagg gtttgtataa gaaagccaga gaagggtgta ttaaagagtt cactgggtatt 480
tcagctcctt acgaagctcc aaaggcccca gagttgcatt taagaactga ccaaagact 540
gttgaagaat gtgctgctat catTTatgag tacctgggtca atgagaagat tatccggaag 600
catctataa 609

<210> 3

<211> 458

<212> PRT

<213> Saccharomyces sp.

<400> 3

Met Val Ala Ser Trp Met Leu Thr Ala Thr Arg Asp Phe Asn Pro		
	5	10 15
Phe Met Phe Val Met Val Met Gly Val Gly Ile Ser Ser Asn Ile		
	20	25 30
Leu Tyr Ser Phe Pro Tyr Pro Ala Arg Trp Leu Arg Ile Cys Ser		
	35	40 45
Tyr Ile Met Phe Ala Ile Thr Cys Leu Ile Phe Ile Ser Val Gln		
	50	55 60
Ala Leu Gln Leu Leu His Met Val Ile Tyr Ile Lys Glu Lys Ser		
	65	70 75
Phe Arg Asp Tyr Phe Asn Glu Tyr Phe Arg Ser Leu Lys Tyr Asn		
	80	85 90
Leu Phe Trp Gly Thr Tyr Pro Met Gly Leu Val Thr Ile Ile Asn		
	95	100 105
Phe Leu Gly Ala Leu Ser Gln Lys Phe Thr Thr Thr Ser Pro Ala		
	110	115 120
Asn Ala Lys His Leu Ile Ile Phe Val Tyr Val Leu Trp Trp Tyr		
	125	130 135
Asp Leu Ala Val Cys Leu Val Thr Ala Trp Gly Ile Ser Phe Leu		
	140	145 150
Ile Trp Gln Lys Tyr Tyr Phe Val Asp Gly Val Gly Asn His Ser		
	155	160 165
Ser Tyr Ser Ser Arg Met Ala Ser Asp His Met Lys Ser Val Leu		
	170	175 180
Leu Leu Asp Ile Ile Pro Leu Val Val Val Ala Ser Ser Gly Gly		
	185	190 195
Thr Phe Thr Met Ser Lys Ile Phe Gly Thr Thr Phe Asp Arg Asn		

200	205	210
Ile Gln Leu Leu Thr Leu Val Ile Cys Ala Leu Val Trp Leu His		
215	220	225
Ala Leu Ile Phe Val Phe Ile Leu Ile Thr Ile Tyr Phe Trp Asn		
230	235	240
Leu Tyr Ile Asn Lys Ile Pro Pro Met Thr Gln Val Phe Thr Leu		
245	250	255
Phe Leu Val Leu Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly Ile Leu		
260	265	270
Leu Leu Thr Asp Asn Ile Arg Lys Tyr Val Glu Lys Tyr Tyr Pro		
275	280	285
Arg Glu Asn Ile Thr Met Glu Gln Glu Ile Leu Thr Ile Met Val		
290	295	300
Pro Trp Cys Phe Lys Val Leu Gly Met Thr Phe Ala Leu Ala Leu		
305	310	315
Ile Ala Met Gly Tyr Phe Phe Thr Val Ile Ser Leu Ile Ser Ile		
320	325	330
Leu Ser Tyr Tyr Asn Glu Arg Val Val Asp Asn Glu Thr Gly Lys		
335	340	345
Val Lys Arg Ile Tyr Thr Phe His Lys Gly Phe Trp Gly Met Thr		
350	355	360
Phe Pro Met Gly Thr Met Ser Leu Gly Asn Glu Glu Leu Tyr Leu		
365	370	375
Gln Tyr Asn Gln Tyr Val Pro Leu Tyr Ala Phe Arg Val Ile Ala		
380	385	390
Thr Ile Tyr Gly Gly Ile Cys Val Cys Trp Ser Ile Leu Cys Leu		
395	400	405
Ser Cys Thr Leu Tyr Gly Tyr Leu Lys Thr Ile Leu His Ala Ala		
410	415	420

Arg Lys Pro Ser Phe Leu Ser Glu Glu Gly Thr Glu Lys Thr Val

425

430

435

Asn Ser Pro Phe Asn Ser Ile Glu Ser Val Glu Glu Ser Asn Ser

440

445

450

Ala Ile Asp Ser Thr Tyr Leu Thr

455

458

<210> 4

<211> 202

<212> PRT

<213> Saccharomyces sp.

<400> 4

Met Ala Thr Asn Ile Thr Trp His Pro Asn Leu Thr Tyr Asp Glu

5

10

15

Arg Lys Glu Leu Arg Lys Gln Asp Gly Cys Thr Val Trp Leu Thr

20

25

30

Gly Leu Ser Ala Ser Gly Lys Ser Thr Ile Ala Cys Ala Leu Glu

35

40

45

Gln Leu Leu Leu Gln Lys Asn Leu Ser Ala Tyr Arg Leu Asp Gly

50

55

60

Asp Asn Ile Arg Phe Gly Leu Asn Lys Asp Leu Gly Phe Ser Glu

65

70

75

Lys Asp Arg Asn Glu Asn Ile Arg Arg Ile Ser Glu Val Ser Lys

80

85

90

Leu Phe Ala Asp Ser Cys Ala Val Ser Ile Thr Ser Phe Ile Ser

95

100

105

Pro Tyr Arg Val Asp Arg Asp Arg Ala Arg Asp Leu His Lys Glu

110

115

120

Ala Gly Leu Lys Phe Ile Glu Ile Phe Val Asp Val Pro Leu Glu
125 130 135
Val Ala Glu Gln Arg Asp Pro Lys Gly Leu Tyr Lys Lys Ala Arg
140 145 150
Glu Gly Val Ile Lys Glu Phe Thr Gly Ile Ser Ala Pro Tyr Glu
155 160 165
Ala Pro Lys Ala Pro Glu Leu His Leu Arg Thr Asp Gln Lys Thr
170 175 180
Val Glu Glu Cys Ala Ala Ile Ile Tyr Glu Tyr Leu Val Asn Glu
185 190 195
Lys Ile Ile Arg Lys His Leu
200

<210> 5

<211> 15

<212> Artificial sequence

<213> M13_for

<400> 5

agtcacgacg ttgta

15

<210> 6

<211> 17

<212> Artificial sequence

<213> M13_rv

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

<210> 7

<211> 22

<212> Artificial sequence

<213> SS-cosF.1

<400> 7

aggcgtatca cgaggccctt tc

22

<210> 8

<211> 29

<212> Artificial sequence

<213> SS-cosR.1

<400> 8

cttatcgatg ataagcggtc aaacatgag

29

<210> 9

<211> 36

<212> Artificial sequence

<213> XVI-1(L)cer-95894

<400> 9

cgcaagctcc gtacgttcaa cattcttatg aacggc

36

<210> 10

<211> 36

<212> Artificial sequence

<213> XVI-1(R)nonSc-106302rv

<400> 10

gcatcatcgt cgtgacctt ctttggcaaa tgcagg

36

<210> 11

<211> 36

<212> Artificial sequence

<213> XVI-2(L)cer-859737

<400> 11

gcgggtatatt tgatggtaaa tctacaagcc ctcggc

36

<210> 12

<211> 35

<212> Artificial sequence

<213> XVI-2(R)nonSc-864595rv

<400> 12

cccagacaca gtttccagta tcacctcgc agaac

35

<210> 13

<211> 26

<212> Artificial sequence

<213> SacI-nonScSSU1_for1

<400> 13

gagctcatgg tcgctagttg gatgct

26

<210> 14

<211> 26

<212> Artificial sequence

<213> BglIII-nonScSSU1_rv1460

<400> 14

agatctcagc ttcagcccaa tccatt

26

<210> 15

<211> 26

<212> Artificial sequence

<213> SacI-ScSSU1_for1

<400> 15

gagctcatgg ttgccaattg ggtact

26

<210> 16

<211> 26

<212> Artificial sequence

<213> BglIII-ScSSU1_rv1406

<400> 16

agatctctcc tacatgaaat gcttgc

26

<210> 17

<211> 120

<212> Artificial sequence

<213> nonScSSU1_for

<400> 17

atggtcgcta gttggatgct cactgccaca agggatttca accctttcat atcgaatatt 60

ctgtacagct gtttgtcatg gttatggggg tcggtatttc ccttgacagt cttgacgtgc 120

<210> 18

<211> 120

<212> Artificial sequence

<213> nonScSSU1_rv

<400> 18

tgtaaatat gtactatcga tagccgagtt tgattcctcc acactttcga acagtcttct 60

ccgtcccttc ctctgataaa tgctgttgaa aggagaattg cgcacttaac ttgcacatctg 120

<210> 19

<211> 120

<212> Artificial sequence

<213> ScSSU1_for

<400> 19

atggttgcca attgggtact tgctcttacg aggagtttg accccttcat gtttatgatg 60

gtcatgggtg tcggcatttc atcgaatatt ctatatagct ccttgacagt cttgacgtgc 120

<210> 20

<211> 120

<212> Artificial sequence

<213> ScSSU1_rv

<400> 20

ttatgctaaa cgcgtaaaat ctagagccga gtttgattct tccacgcttt caatgctgtt 60

atacggagaa actgtcgtct tttccgtacc tgactctgaa cgcacttaac ttgcacatctg 120

<210> 21

<211> 120

<212> Artificial sequence

<213> nonScSSU1_for+pGAPUR

<400> 21

atggtcgcta gttggatgct cactgccaca agggatttca accctttcat gtttgtcatg 60

gttatggggg tcggtatttc atcgaatatt ctgtacagct ccggagctta ccagttctca 120

<210> 22

<211> 120

<212> Artificial sequence

<213> nonScSSU1_rv+AUR1-C

<400> 22

tgttaaatat gtactatcga tagccgagtt tgattcctcc acactttcga tgctgttgaa 60

aggagaattg acagtcttct ccgtcccttc ctctgataaa tcgactctag aggatccaga 120

<210> 23

<211> 20

<212> Artificial sequence

<213> ScSSU1_for331

<400> 23

tcgaaagcga acacgacgaa

20

<210> 24

<211> 21

<212> Artificial sequence

<213> ScSSU1_982rv

<400> 24

cgacagaaat cacggtgaaa a

21

<210> 25

<211> 22

<212> Artificial sequence

<213> nonScSSU1_329

<400> 25

tgtcacaaaa atttaccacg ac

22

<210> 26

<211> 22

<212> Artificial sequence

<213> nonScSSU1_981rv

<400> 26

aagggaaatt accgtaaaga ag

22

<210> 27

<211> 21

<212> Artificial sequence

<213> PDA1_for1

<400> 27

atgtttgtcg cacctgtatc t

21

<210> 28

<211> 18

<212> Artificial sequence

<213> PDA1_730rv

<400> 28

gattagaggc accatcac

18

<210> 29

<211> 33

<212> Artificial sequence

<213> SacI-nonSc-MET14_for-21

<400> 29

ctcgagctct cgtgaaattc attgaaacaa atg

33

<210> 30

<211> 30

<212> Artificial sequence

<213> BamHI-nonSc-MET14_rv618

<400> 30

ggatccttat aagatttata gatgcttccg

30

<210> 31

<211> 33

<212> Artificial sequence

<213> SacI-ScMET14_for

<400> 31

ctcgagctca gaaaagttgg aattatttct cca

33

<210> 32

<211> 30

<212> Artificial sequence

<213> BamHI-ScMET14_rv

<400> 32

ggatccaatg tacagtaatc ggtcaaatta

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ビール酵母全染色体構造を示す図である。白抜きは S c 型、黒抜きは非 S c 型染色体を示す。楕円はセントロメアを示す。ローマ数字はそれぞれ対応する *S. cerevisiae* の染色体番号を示す。非 S c 型染色体を示す図で、黒の塗り潰し部分はその領域で連結していることを示している。例えば nonScII-nonScIV は黒の塗り潰し部分 (300kb) で nonScII と nonScIV が連結していることを示している。

【図 2】 34/70 株のゲノム DNA より調製した 3648 個のコスミドの両端塩基配列と *S. cerevisiae* ゲノム塩基配列との同一性分布を示す図である。横軸は *S. cerevisiae* との相同性を示し、例えば横軸 84 は 82% より大きく、84% 以下の相同性を示している。縦軸は、その同一性を示すコスミド塩基配列の個数を示す。

【図 3】 コスミド、ショットガンクローンの *S. cerevisiae* ゲノム塩基配列へのマッピング例を示す図である。①、②、③はそれぞれ、*S. cerevisiae* X V I 番染色体塩基配列上のワトソン鎖に存在する遺伝子、塩基配列、クリック鎖上に存在する遺伝子を示す。④、⑤、⑥はそれぞれ、S c 型塩基配列由来のコスミドクローン、非 S c 型由来のコスミドクローン、S c 型塩基配列由来のショットガンクローン、非 S c 型塩基配列由来のショットガンクローンを示す。

【図4】 コンティグの*S. cerevisiae*ゲノム塩基配列へのマッピング例を示す図である。①は*S. cerevisiae*X V I 番染色体の模式図を示す。②はX V I 番染色体の857～886 kb部分を拡大した図である。③はX V I 番染色体塩基配列、④はコンティグおよびそのコンティグ名を示す。⑤はショットガンフォワード鎖、リバーズ鎖が異なるコンティグ内に存在する場合、これらのコンティグ間を連結させた直線である。⑥はコスミドクローンのフォワード鎖、リバーズ鎖が異なるコンティグ内に存在する場合、これらのコンティグ間を連結させた線である。

【図5】 34/70株のゲノムDNAをDNAマイクロアレイにハイブリさせ、プローブの輝度を*S. cerevisiae*S 288 C株と比較したシグナル比(Signal log ratio)を第16番染色体上のプローブについて整列させた結果を示す。楕円で囲んだ2箇所でシグナル比の顕著な変化が認められ、この部分でSc型、非Sc型の乗換えが生じていることが示唆される。

【図6】 DNAマイクロアレイとPCRによる解析結果から推定される34/70株の第16番染色体の構造を示す。

【図7】 SSU1遺伝子破壊株を用いたビール試験醸造における発酵過程の経時変化を示す図である。3つのグラフの横軸はいずれも発酵時間を表しており、縦軸はそれぞれa) 酵母増殖量(OD600)、b) 外観エキス濃度(w/w%)、c) 亜硫酸量(ppm)を示している。

【図8】 SSU1遺伝子高発現株を用いたビール試験醸造における発酵過程の経時変化を示す図である。3つのグラフの横軸はいずれも発酵時間を表しており、縦軸はそれぞれa) 酵母増殖量(OD600)、b) 外観エキス濃度(w/w%)、c) 亜硫酸量(ppm)を示している。

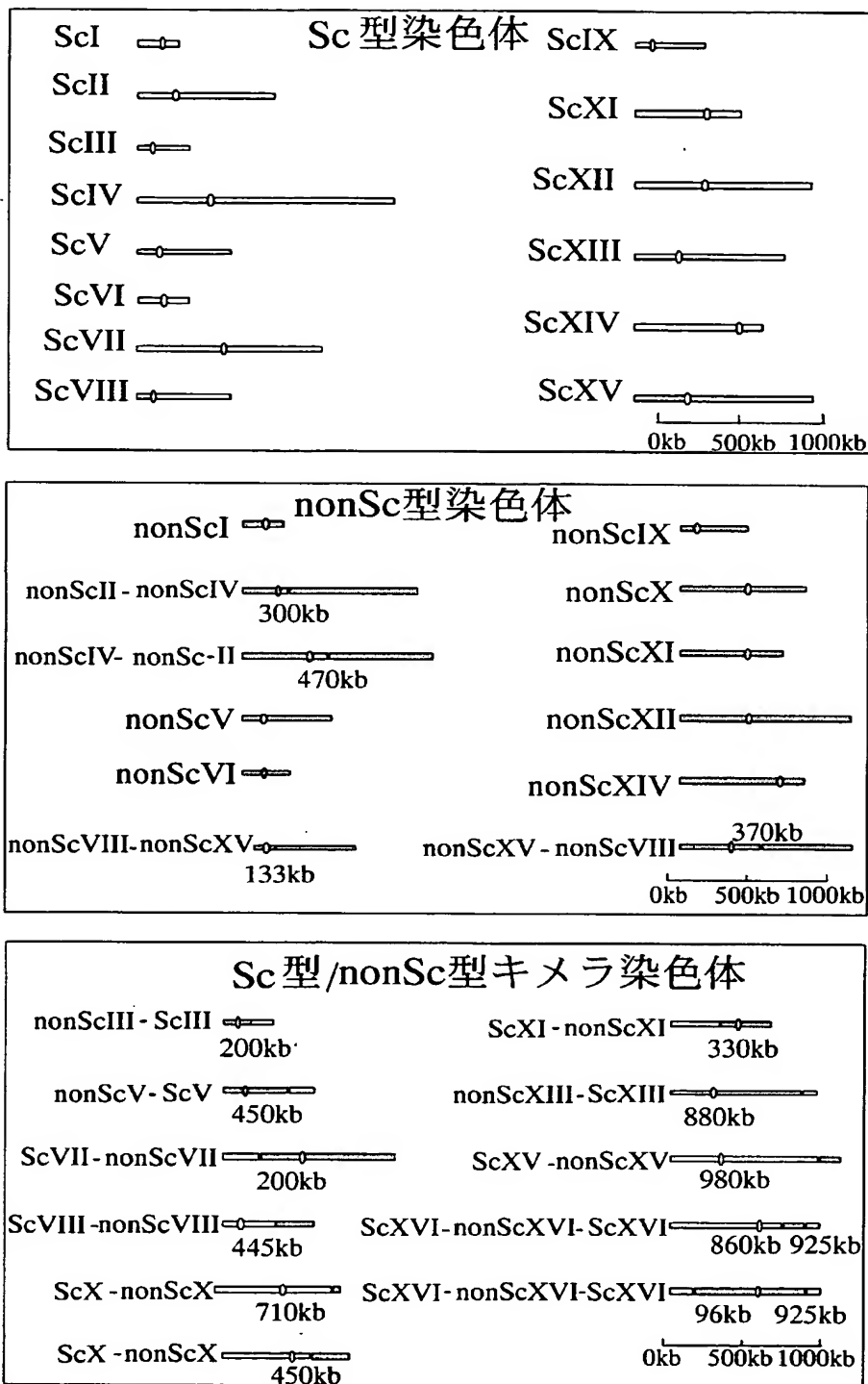
【図9】 MET14遺伝子後発減株を用いたビール試験醸造における発酵過程の経時変化を示す図である。グラフの横軸は発酵時間を、縦軸は亜硫酸量(ppm)を表している。

【図10】 解析した各SSU1構造遺伝子の塩基配列を示す図である。

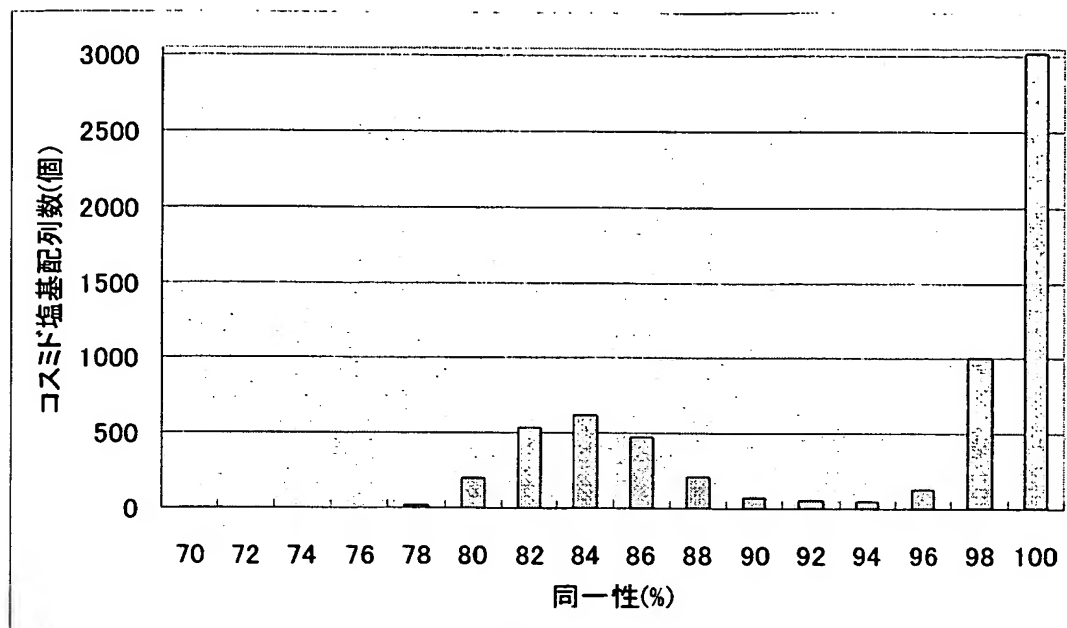
【図11】 解析した各MET14構造遺伝子の塩基配列を示す図である。

【書類名】 図面

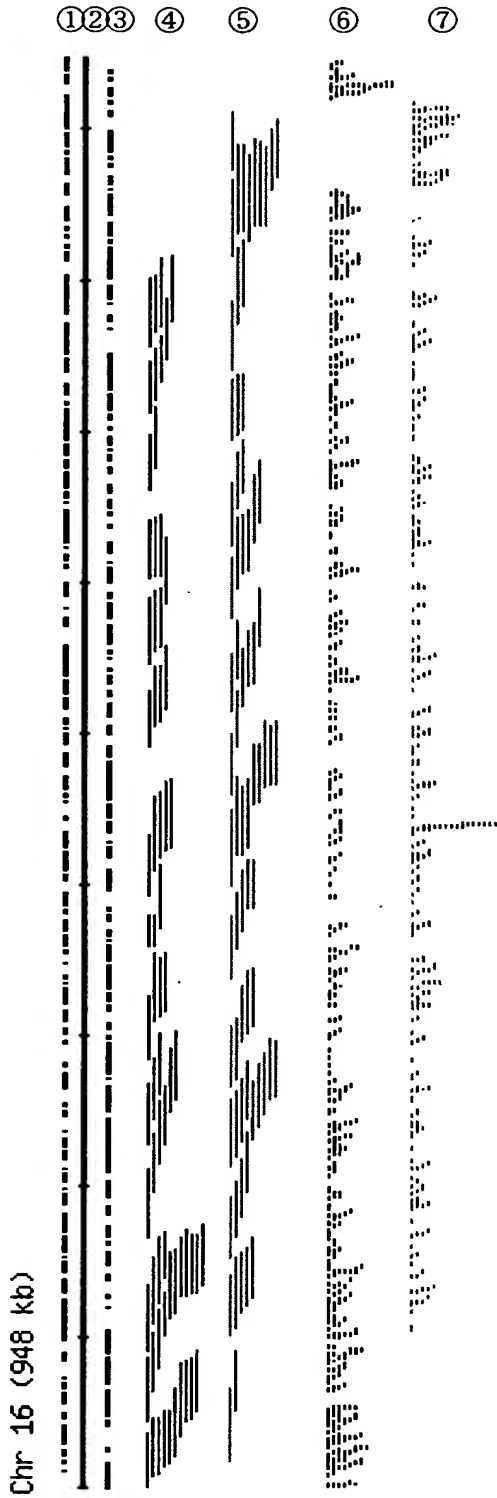
【図 1】



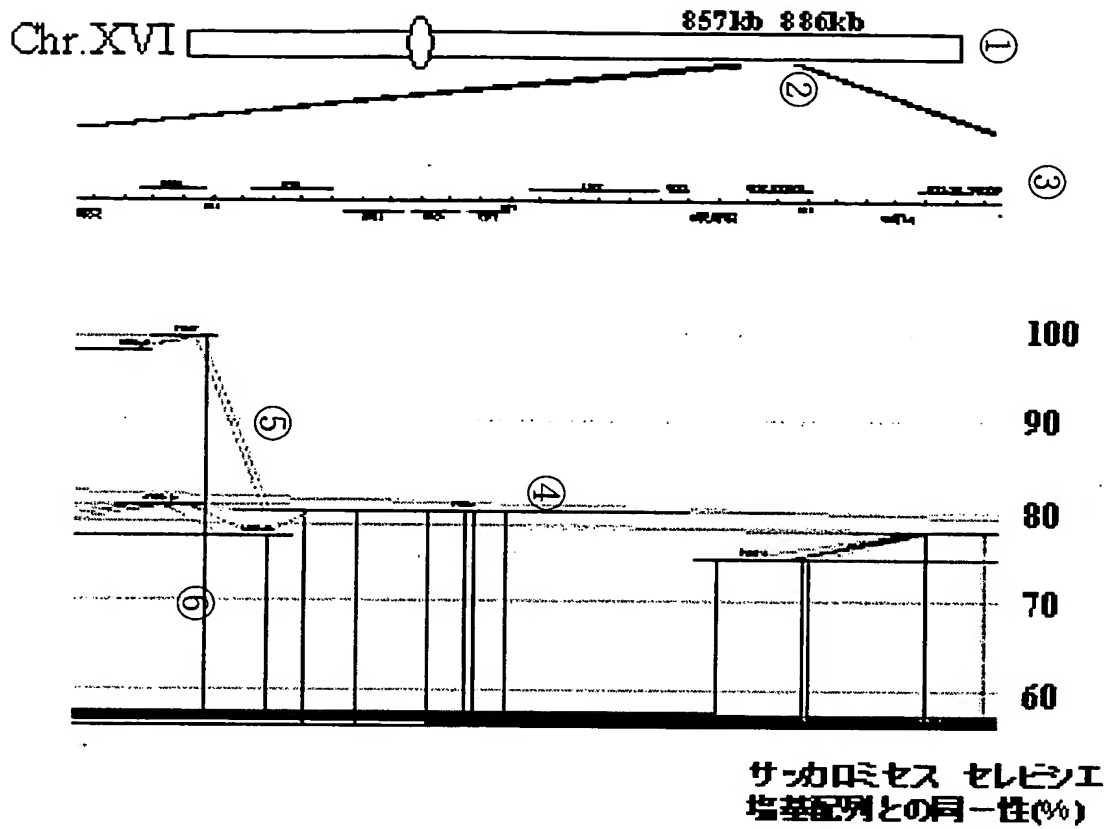
【図 2】



【図 3】

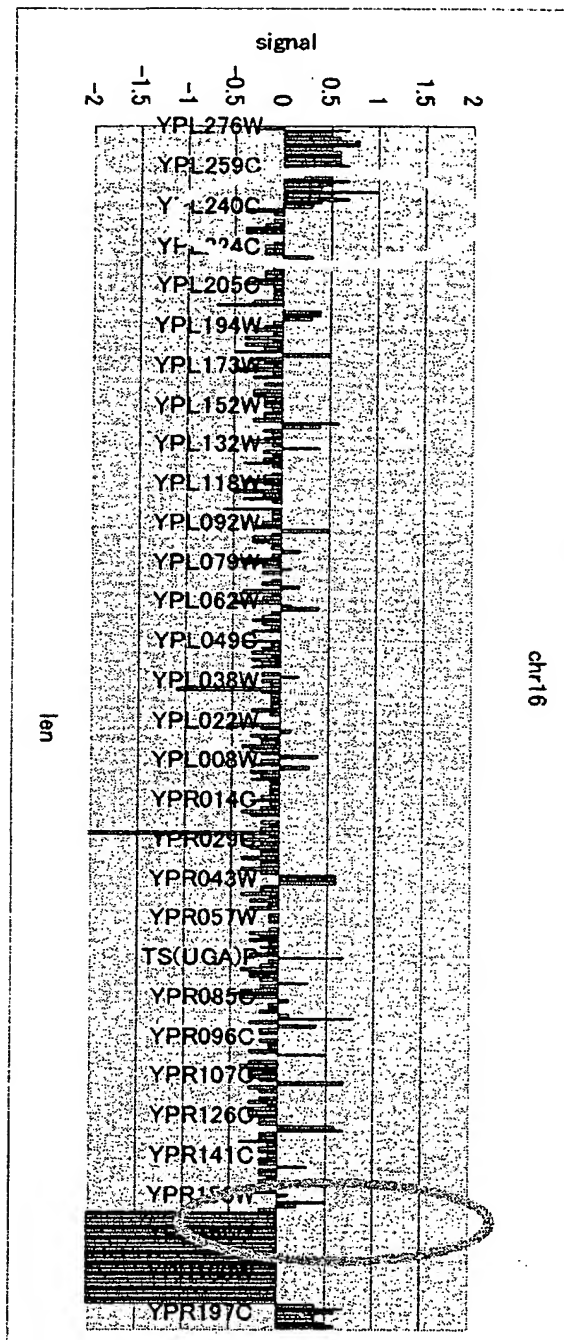


【図 4】

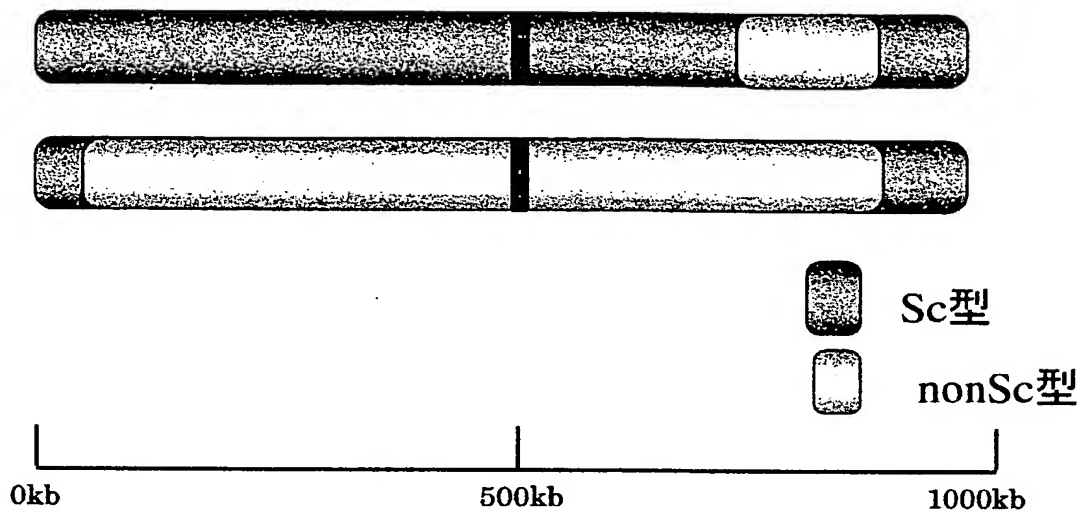


【図 5】

Chr.XVI

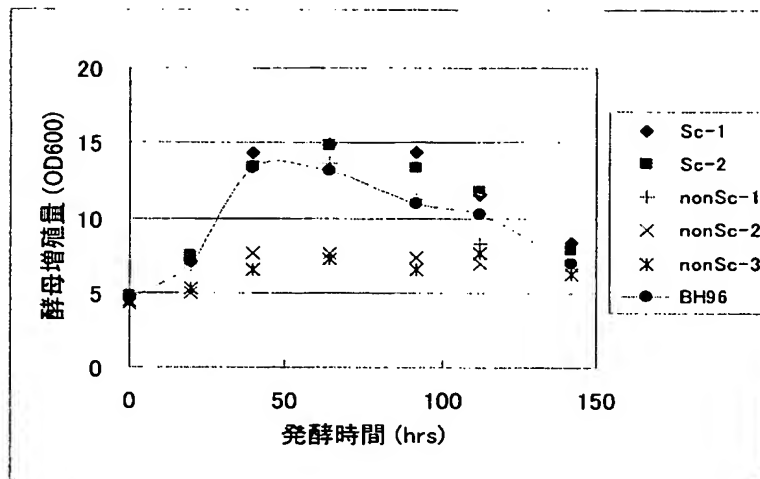


【図 6】

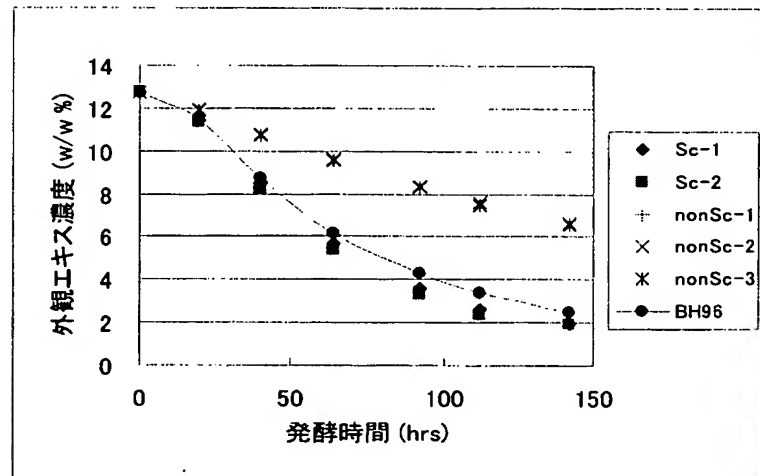


【図 7】

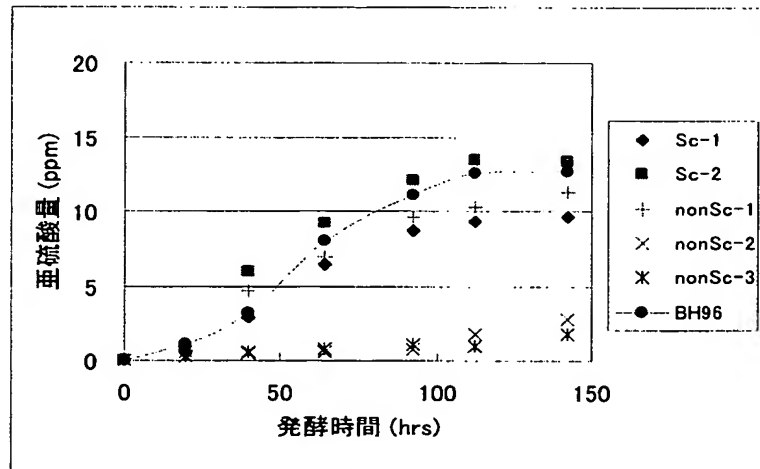
a)



b)

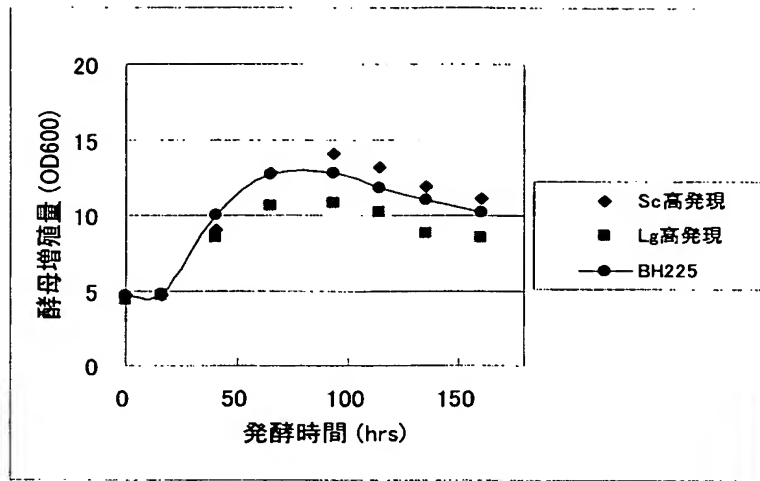


c)

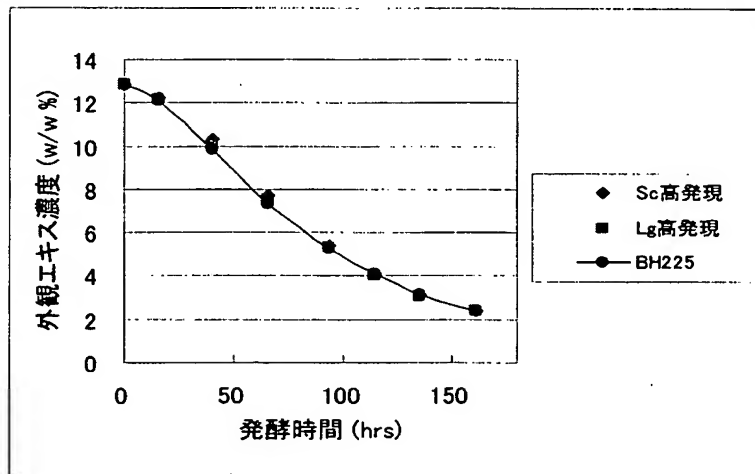


【図 8】

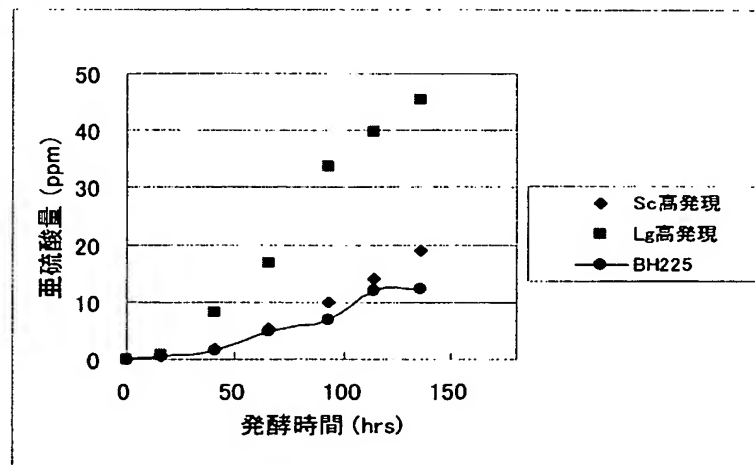
a)



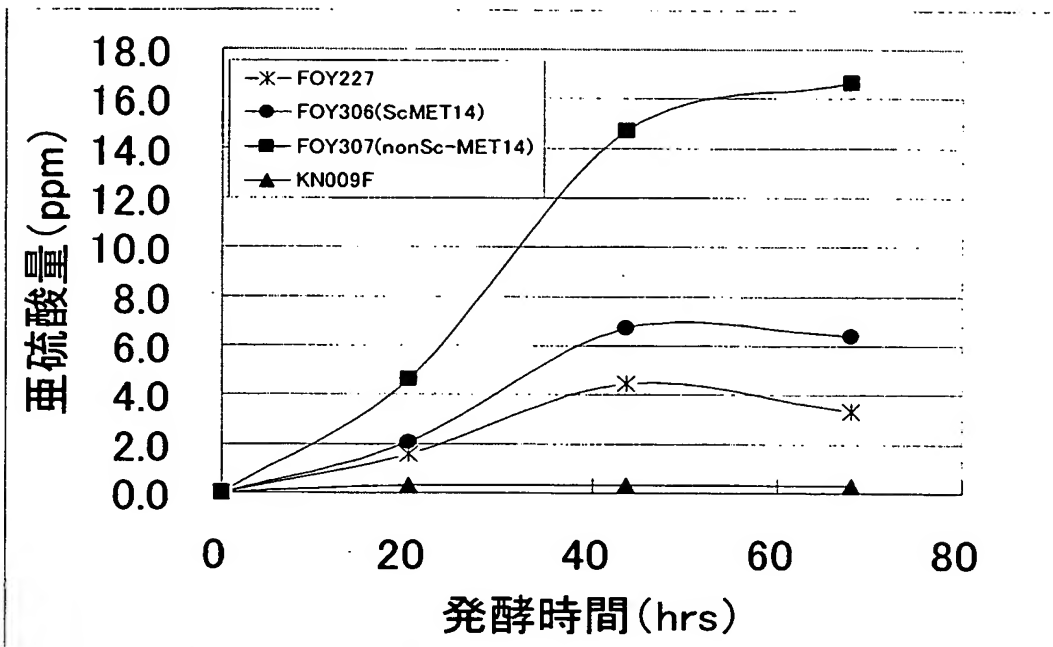
b)



c)



【図 9】



【図 10】

ScSSU1	
1	atgggtgccat atgggtlact tgcctttacg aggcagtttg accccttcat
51	gtttatgaig gtcatgggig tggcatllc atcgaatatt ctatatagtc
101	lcccatatcc tgcagggtgg ctaagaatat gcctclacat catgtttgct
151	atcactlgcc ttatttticat tgcgtgcag gcactacaaa tattacattt
201	gattgtctat attaaggaga aaagcttcag agaataittt aatgactttt
251	tcagaaatat gaagcacagt ttattttggg gtacttaacc catggggtaa
301	gttacaatta laaatllctt aggcgcctc tgcgaagcga acacgacgaa
351	gagccccact aatccagaa attgatgat attgtttac gtcgttggtt
401	ggatgatct cgcagtcgt ctagtaatag cgtggggat ctcgtttctc
451	atcggcatg actattacac ttgggaaggg atgggaatc atccttcata
501	taatacaaaa atggcatccg aaaacatgaa aagtgtattg ctacgtgala
551	tcattccgct gggtgtcgt gcitcaagti glggaacatt cacaatgtca
601	gaaatattct tccatgcgt taatagaaa atccaactga taacgttggt
651	catatgtgcc ttaacgtggc tgcattccat taatctgtc ttacatctga
701	ttcggataa ctctggagt ctltatatta ataagatacc accaatgaca
751	caggttttca cctattcct gcttttgggc ccgattgggc aaggaaattt
801	tggagcttta ttgcttacag ataataaaa aaaataatgc ggcaaatatt
851	acccaacaga taacattaca agagaacaag agataatgac taatgcattt
901	atcgggtgt tcaaaattct aggcattgtt tctgtatgg catgtctgc
951	taagggtat ttcttaccg tgattctgt cgtttcaatc ctgtctact
1001	acaataaaaa agagattgaa aacgagacag gaaaagtga gagatttat
1051	accitccaca aaggttttg ggggatgact tccccatgg gtacatgtc
1101	tttaggaac gaagattat atgtgcagta taaccagtac gtccccat
1151	atgcatttag agtccatgga accatatacg gcgggtttg cgtttgttgg
1201	tcaattctat gccctttatg cacattgcat gattattcta aaaagatgt
1251	gcatgtgcc cgtaaactt catattttc agatcaggt acggaaaaga
1301	cgcagatttc tccgtatac agcattgaaa gcgtggaaga atcaaacctg
1351	gccttagatt ttacgcgtt agcataa

nonScSSU1	
1	atggctgcta gtggatgct cactgccaca agggattca accccttcat
51	gtttgtcatg gtatggggg tggatattc atcgaatatt ctgtacagct
101	tcccatatcc ggcgagggtg ctgaggatat gcctgtacat catgtttgcc
151	attacatgtt tgatttticat ctctgtacag gcgtgtcagc ttitgcacat
201	gtatcatat atcaaaagaa aaagctttag agattacttc aatgaatatt
251	tcagaagtct gaagtacaa ttattttggg gtacttaacc catgggatta
301	gtacaataca taattttttt gggggcgcgt tcacaaaaat taccacgac
351	aagcccgtcg aatgccaagc acttgatcat ttgttttac gtccgttggt
401	gtatgacct cgcggttgt ttatgaaccg ctgggggat ttcatcttc
451	atctggcaaa agtactactt cgtggacggg gtgggaatc actcttcata
501	cagtacacga atggcttcg accacatgaa aagcgtactg ttgttagata
551	tcattccgct ggctgtgtc gcttcgagcg gtgggacatt tacaatgtca
601	aaaataatcg gtaccacttt tgataggaa atccaatgc taacattgtt
651	catctgtgcc ctggtttggc tacacgtctt tatattgtc ttattctga
701	ttacaatata ctctgggat ctltacatca ataagatacc accaatgacg
751	caggtaattt cgtgtttctt ggtattggg ccatggggc aaggaaattt
801	tggatatttg ttgcttacg acaataaag aaagtatga gaaaaatatt
851	acccaaggga aaacatcacc atggaacaag aaatactaac catatgggt
901	ccgtgtgtt tcaaggttct gggcatgaca ttgtcttgg catlaatgc
951	taagggttac ttctttacgg taatttcctt taattcgatt ttatcatact
1001	acaatgaaa agttgtgac aatgaacag gcaaaagtga aaggatctac
1051	actttccata aaggttttg ggggatgact tccccatgg gtacatgtc
1101	tttgggaac gaggagctt atctgaata caaccagtat gtccccat
1151	atgcattcag agcatagct accatataig gtggtattg ttgtgtctg
1201	tcaatcttat gccctctgt caggtgtat ggttaccga aaacgattct
1251	ccatgtgtcc cgtaaactt cgtttttatc agaggaaagg acggagaaga
1301	ctgtcaatc tctttcaac agcatgaaa gtgtggagga atcaaacctg
1351	gtatcgata gtacatattt aacataa

【図 11】

ScMET14					
1	atggctacta	atattacttg	gcatccaaat	cttacttacg	acgaacgcaa
51	ggcatlgaga	aaacaggacg	gttgtactat	tgggttaaca	ggcttaagtg
101	cgtcaggtaa	aagtacaatc	gcctgtgcgc	tagaacagtt	actgctccaa
151	aaaaacttgi	ctgcalatag	attggaiggt	gacaacattc	gttttggatt
201	gaacaaggat	tgggtttct	cagaaaagga	cagaaatgaa	aacattcgta
251	gaattagcga	agtttctaag	ctatttgcig	attcatlgic	tatttcaatc
301	acctcattta	tcctccata	cagagtigac	agagatagag	ctcgtgaact
351	acataaggag	gctggtttga	agttcatiga	aattattgtt	gatgttccat
401	tagaagtcgc	tgagcaaagg	gaccctaagg	gtttatataa	gaaagctagg
451	gaggggtgaa	tcaaggagtt	tacaggtaatt	tcigcccat	atgaagcgcc
501	aaaagctcca	gagctacatt	tgagaaccga	ccagaagacg	gttgaagaat
551	gtgctaccat	tatttatgag	tacttaalca	gtgaaaaaat	catccgtaag
601	catttgtaa				

nonScMET14					
1	atggctacta	atactacttg	gcatccaaat	cttacctacg	acgaacgtaa
51	ggaattlaaga	aagcaagacg	gctgtaccgt	tgggttgacc	ggcttaagtg
101	cgtcaggaaa	aagtacaata	gcttgtgcac	tggaacaatt	actgcttcaa
151	aaaaacttat	ctgcttatag	gttagatggt	gataacattc	gttttggttt
201	gaataaggat	tgggcttct	cagaaaagga	cagaaatgaa	aacattcgta
251	gaattagtga	agtttccaag	ctattcgcig	attcgtgtgc	tgtatccaic
301	acttcattta	tttccccata	cagagtcgat	agagacagag	cccgtgattt
351	acataaggaa	gcaggcttga	agttcatiga	aatttttgtt	gatgttccat
401	tagaagtcgc	tgagcaaaga	gaccctaagg	gtttgtataa	gaaagccaga
451	gaaggltiga	ttaaagagtt	cactggtaatt	tcagctccct	acgaagctcc
501	aaaggcccca	gagttgcatt	taagaactga	ccaaaagact	gttgaagaat
551	gtcgtgctat	catttatgag	taccgggtca	atgagaagat	tatccggaag
601	catctataa				

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 工業用酵母、特にビール等の酒類の製造に用いられる醸造用酵母の全ゲノム塩基配列データベースを作製し、そのデータベースを基に、醸造用酵母が特異的に有する醸造特性に関わる遺伝子を選択し、その遺伝子の機能解析を行い、その遺伝子を破壊したり又は、高発現させることにより、目的とする醸造特性に関わる遺伝子を選択する方法を提供することを目的とする。また当該遺伝子に関わる醸造特性を発揮する酵母を育種する方法並びにこの酵母を用いて生産性や品質を向上させたアルコール又は酒類を製造する方法を提供することを目的とする。更にはその醸造用酵母特有の遺伝子及びその遺伝子がコードするペプチドを提供することも目的とする。

【解決手段】 (イ)工業用酵母の全ゲノム塩基配列を解析し、(ロ)該ゲノム塩基配列を*Saccharomyces cerevisiae*の全ゲノム塩基配列と比較し、(ハ) *Saccharomyces cerevisiae*の遺伝子がコードするアミノ酸配列と70～97%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする当該工業用酵母の遺伝子を選択し、(ニ)当該選択された遺伝子の機能解析を行うことによって当該遺伝子が酵母に付与する特性を同定することを特徴とする、アルコール又は酒類の製造においてその生産性の向上及び／又は香味の改善に関わる遺伝子のスクリーニング方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 5 7 6 7 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 9 0 4]

1 . 変 更 年 月 日

1 9 9 0 年 8 月 1 3 日

[変 更 理 由]

新 規 登 録

住 所

大 阪 府 大 阪 市 北 区 堂 島 浜 2 丁 目 1 番 4 0 号

氏 名

サ ン ト リ ー 株 式 会 社